

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs)
del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la
respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa
en pacientes con cáncer de mama.**

Diana Carolina Guerrero Pulido

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina- Maestría en Genética Humana
Bogotá, Colombia
2017

**Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs)
del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la
respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa
en pacientes con cáncer de mama.**

Diana Carolina Guerrero Pulido

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

Ph.D Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez.

Co-Investigador:

MSc Luis Eduardo Pino Villarreal MD

Línea de Investigación:

Cáncer de mama

Grupo de Investigación:

Farmacogenética del Cáncer

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina- Maestría en Genética Humana
Bogotá, Colombia
2017

Todo lo que vivamente imaginamos, ardientemente deseamos, sinceramente creemos y entusiastamente emprendemos... inevitablemente sucederá.

Paul J. Meyer

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todas las instituciones, dependencias y personas que hicieron posible el desarrollo de este proyecto, en especial:

A mis padres por su apoyo incondicional, amor y preocupación.

A mi esposo por su amor, comprensión y apoyo en los momentos difíciles; por su interés en lo que hago y por ayudarme en la medida de sus posibilidades a cumplir con esta gran meta.

A la Universidad Nacional de Colombia y a los profesores de la maestría en Genética Humana en especial Mauricio Rey y Clara Arteaga, por todos los conocimientos brindados, su interés, disponibilidad y vocación en su labor como docentes que contribuyeron enormemente en mi formación.

A mi director de tesis, Fabio Aristizábal, por su paciencia, colaboración, orientación, confianza y entusiasmo para emprender este trabajo.

Al Dr. Luis Eduardo Pino por creer en mí proyecto, por aceptarme en la Unidad de Investigación del Hospital Militar Central y por la oportunidad para crecer en la academia, en lo profesional y en lo personal.

A la Facultad de Medicina por los recursos del proyecto con código QUIPU: 201010025205, los cuales fueron empleados para financiar una parte de la fase experimental del estudio.

A la Dra. Ana Santos y el Dr. Jhon Londoño por poner a mi disposición la infraestructura de su laboratorio junto con las muestras de su proyecto, por su confianza, apoyo y generosidad.

A la Dra. Natalia Olaya por su guía, apoyo y confianza y al Dr. Edgar Benítez por su importante asesoría en la estadística del trabajo.

A mis compañeros de maestría Carolina, Andrea, Ángela, Daniel, y Jhony por su apoyo, por los trasnochos compartidos y por ver el lado ocurrente a todo lo sucedido.

A mis compañeros del grupo de Farmacogenética del cáncer por compartir sus conocimientos y sus aportes y en forma muy especial a Erika Pachón y Viviana Ariza por brindarme su amistad.

Resumen

El producto génico de CYP19A1 es una proteína llamada Aromatasa perteneciente a la superfamilia del citocromo P450 y cuya función es generar la conversión de la androstenediona y testosterona en estrona y estradiol. Muchos de los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) de CYP19A1 afectan la actividad de la enzima y han sido implicados con el pronóstico, la eficacia terapéutica y la toxicidad de los inhibidores de la aromatasa de tercera generación. Según la etnicidad, la distribución de frecuencia de los alelos CYP19A1 de acuerdo con los datos del HapMap y del Proyecto de los 1000 genomas Fase 3 es distinta, y hasta ahora, no hay datos disponibles para población Colombiana. Utilizando la plataforma MassArray de Agena Bioscience (Sequenom), como la mejor opción de genotipificación, fueron determinadas las frecuencias genotípicas y alélicas de 12 SNPs y 1 VNTR de CYP19A1 con relevancia farmacogenética en 270 sujetos y 32 pacientes con cáncer de mama y tratamiento con IA. Las frecuencias de los alelos menores para los SNPs rs7176005 (T), rs6493497 (A), rs1062033 (G), rs10459592 (G), rs4775936 (T), rs727479 (G), rs700518 (G), rs700519 (T), rs10046 (T), rs4646 (A), rs16964189 (T) y rs934635 (A) fueron: 18.7, 18.2, 31.8, 50.8, 31.3, 40.4, 34.6, 3.1, 36.9, 46.7, 14.9 y 25 respectivamente. El análisis genético de CYP19A1 evidenció que la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos farmacológicamente relevantes, fueron comparables con poblaciones americanas (mexicanos, peruanos y puertorriqueños) y significativamente diferentes con poblaciones de ancestría africana, asiática y europea. El modelo usado para el análisis no encontró estadísticamente ninguna asociación entre el estado de los polimorfismos seleccionados y las características clínicas de respuesta, no obstante algunas variantes tales como rs60271534, rs7176005 y rs4646 mostraron un comportamiento que potencialmente, con un tamaño de muestra mayor, podría representar una relación con la presentación o no de efectos adversos musculoesqueléticos y adicionalmente para el caso del polimorfismo rs60271534, con la manifestación o no de efectos vasomotores.

Palabras clave: Farmacogenética, Inhibidores de Aromatasa, CYP19A1, polimorfismos.

Abstract

The CYP19A1 gene product is a protein called Aromatase which belongs to the cytochrome P450 superfamily and whose function is to generate the conversion of androstenedione and testosterone to estrone and estradiol. CYP19A1 single nucleotide polymorphisms (SNPs) affect enzyme activity and have been implicated in the prognosis, therapeutic efficacy and toxicity of third generation aromatase inhibitors. According to ethnicity, the frequency distribution of CYP19A1 alleles according to HapMap and 1000 Genomes Project is different, and so far no data are available for the Colombian population. Using the Agena Bioscience (Sequenom) MassArray platform as the best genotyping option, the genotypic and allelic frequencies of 12 SNPs and 1 CYP19A1 VNTR with pharmacogenetic relevance were determined in 270 subjects and 32 patients with breast cancer and AI. The frequencies of the minor alleles for SNPs rs7176005 (T), rs6493497 (A), rs1062033 (G), rs10459592 (G), rs4775936 (T), rs727479 (G), rs700518 (G), rs700519 (T), rs10046 (T), rs4646 (A), rs16964189 (T) and rs934635 (A) were: 18.7, 18.2, 31.8, 50.8, 31.3, 40.4, 34.6, 3.1, 36.9, 46.7, 14.9 and 25 respectively. Genetic analysis of CYP19A1 showed that the distribution of allelic frequencies of pharmacologically relevant polymorphisms were comparable with American populations (Mexican, Peruvian and Puerto Rican) and significantly different with populations of African, Asian and European ancestry. The model used for the analysis did not find statistically any association between the state of the selected polymorphisms and the clinical response characteristics, however some variants such as rs60271534, rs7176005 and rs4646 showed a behavior that potentially, with a larger sample size, could Represent a relation with the presentation or not of musculo-skeletal adverse effects and additionally for the case of polymorphism rs60271534, with the manifestation or not of vasomotor effects.

Keywords: Pharmacogenetics, Aromatase inhibitors, CYP19A1, polymorphisms.

Contenido

Lista de figuras	9
Lista de tablas.....	10
Introducción.....	13
1. Justificación y planteamiento del problema	15
2. Marco teórico	16
2.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	16
2.2 Clasificación del cáncer de mama	18
2.3 Estado del receptor de estrógenos	18
2.4 Terapias Hormonales	20
2.5 Inhibidores de Aromatasa	21
2.6 Aromatasa	24
2.7 Efectos adversos - riesgos y beneficios a largo plazo	26
2.8 Polimorfismos en el gen de la aromatasa	27
2.9 Influencia de los polimorfismos en CYP19A1 en el tratamiento con inhibidores de Aromatasa.....	31
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo General.....	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. Metodología	38
4.1 Tamaño de la muestra.....	38
4.2 Sujetos de estudio	38
4.3 Selección de pacientes.....	40
4.4 Recolección y Procesamiento de la Muestra:	40
4.4.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica.....	40
4.4.1.1 Digestión.....	41
4.4.1.2 Precipitación de ADN	41
4.4.1.3 Rehidratación del ADN.....	42
4.4.1.4 Cuantificación de ADN	42
4.5 Selección de SNP	42
4.6 Genotipificación	43
4.6.1 Estudio de Polimorfismos de nucleótido único (SNPs)	43
4.6.2 Estudio de Polimorfismo en el número de repetición en tándem (VNTR)	48
4.7 Estimación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas de los SNPs para el Gen CYP19A1	50
4.8 Definición del tipo de respuesta	50
4.9 Análisis estadístico	51
4.10 Consideraciones éticas.....	52
5. Resultados y Discusión	52
5.1 SNPs Seleccionados	52

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

5.2	Estadística Descriptiva – Población de Estudio	56
5.3	Análisis Genéticos	59
5.4	Comparación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas para el Gen CYP19A1.....	63
5.5	Descripción de características clínicas del grupo de pacientes colombianas con cáncer de mama portadoras de las variantes genéticas estudiadas.....	69
5.6	Consideraciones Finales.....	75
6.	Conclusiones y Recomendaciones	75
6.1	Conclusiones.....	75
6.2	Recomendaciones	76
7.	Bibliografía.....	77
A.	Anexo: Aprobación de la Junta de Revisión Institucional del Comité de Ética de La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.....	84
B.	Anexo: Aprobación de la Junta del Comité de Ética del Hospital Militar Central	86
C.	Anexo: Consentimiento informado para la participación en el proyecto.	88
D.	Anexo: Autorización para la toma de muestra e inclusión voluntaria en la investigación.	91
E.	Anexo: Cuestionario para la participación en el proyecto de investigación.....	93

Lista de figuras

Figura 2-1. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama a nivel mundial.....	16-17
Figura 2-2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama estandarizadas por edad (ASR) en Colombia.	17
Figura 2-3. Estructura de andrógenos y de los inhibidores de aromatasa....	22
Figura 2-4. El gen de la aromatasa (CYP19A1).....	25
Figura 2-5. Polimorfismos en el gen de la aromatasa (CYP19A1).....	28
Figura 5-1. Cluster A gena del polimorfismo rs727479.....	60

Lista de tablas

Tabla 2-1. Polimorfismos en el gen de la aromatasa (CYP19A1) Localización y frecuencias alélicas en población caucásica americana y México americana. Fuente: Ma et al., 2005.....	28-30
Tabla 4-1. Localización y Alelos esperados para los polimorfismos seleccionados en el gen de la aromatasa (CYP19A1).....	44-45
Tabla 4-2. Diseño para la genotipificación de los polimorfismos seleccionados en el gen de la aromatasa (CYP19A1)- Parte A y B.....	46-47
Tabla 4-3. Iniciadores empleados en la genotipificación de rs60271534 en CYP19A1.....	48
Tabla 4-4. Mezcla de reacción empleada en la amplificación de rs60271534 en CYP19A1.....	49
Tabla 4-5. Condiciones de PCR empleadas en la amplificación de rs60271534 en CYP19A1.....	49
Tabla 5-1. Polimorfismos en el gen de la aromatasa (CYP19A1) seleccionados para el estudio.....	53-55
Tabla 5-2. Características y resultados clínicos de las pacientes con cáncer de mama.....	57-59
Tabla 5-3. Frecuencias Genotípicas y fenotípicas observadas de los SNPs seleccionados de CYP19A1.....	62
Tabla 5-4. Resultados Prueba X^2 – Equilibrio de Hardy- Weinberg.....	62-63
Tabla 5-5. Comparación de las frecuencias genotípicas y fenotípicas de SNPs de CYP19A1 en varias poblaciones.....	64-67
Tabla 5-6. Diagnóstico de Covariabilidad.....	70
Tabla 5-7. Relación en el número de repeticiones de rs60271534 y VMS.....	71
Tabla 5-8. Relación en el número de repeticiones de rs60271534 y MS-AEs.	72
Tabla 5-9. Relación de rs7176005 y MS-AEs de acuerdo con el NCI.....	73
Tabla 5-10. Relación de rs4646 y MS-AEs de acuerdo con el NCI.....	74

Lista de Símbolos y abreviaturas

AA:	Afroamericanos
AFR:	Africanos
AMR:	Mezcla de Americanos
ASCO:	Sociedad Americana de Oncología Clínica
ASW:	Proyecto de los 1000 Genomas;
CEU	Residentes de Utah con ascendencia de Europa del Norte y Occidente
CLM	Colombianos de Medellín
DBD:	Dominio central de unión al DNA
DFS:	Supervivencia libre de la enfermedad
E2:	Estradiol
EA:	Americanos Europeos
EAS:	Asia Oriental
EGF:	Factor de crecimiento epidermal
ER :	Receptor Hormonal de Estrógeno
EUR:	Europeos
EXT1_CALL:	Primera variante alélica
EXT1_MASS:	Masa de la secuencia del primer de extensión + genotipo de la primera variante alélica
EXT1_SEQ:	Secuencia del primer de extensión + primera variante alélica
EXT2_CALL:	Segunda variante alélica
EXT2_MASS:	Masa de la secuencia del primer de extensión + genotipo de la segunda variante alélica
EXT2_SEQ:	Secuencia del primer de extensión + segunda variante alélica
FISH:	Hibridación fluorescente in situ
GIH:	Indios de Gujarat en Houston, Texas;
HCB:	Han Chino en Japón, Beijing y China;
HER2/neu:	Factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
HOMIC:	Hospital Militar Central
IA:	Inhibidores de Aromatasa
INC:	Instituto Nacional de Cancerologia
JPT:	Japoneses en Tokio, Japón
LBD:	Dominio de unión a ligando
MEX:	Residentes con ascendencia mexicana en Los Ángeles, California
MP_CONF:	Puntuación de la amplificación multiplex
MS-AEs:	Eventos adversos músculo-esqueléticos y óseos relacionados con los inhibidores de la aromatasa
NI:	No indica
NR:	Receptores nucleares

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

OS:	Supervivencia global
PcGC:	Porcentaje de GC contenido en el primer de extensión
PFS:	Supervivencia libre de progresión
PR:	Receptor Hormonal de Progesterona
SAS:	Asia meridional
SERMs:	Moduladores Selectivos del ER
SNPs :	Polimorfismos de nucleótido simple
TAM:	Tamoxifeno
TERM:	Química de terminación
Tm(NN):	Temperatura de melting para el primer de extensión
TTF:	Tiempo hasta el fracaso del tratamiento
TTP:	Tiempo hasta la progresión de la enfermedad
UEP_DIR:	Dirección del primer de extensión
UEP_MASS:	Masa del primer de extensión
UEP_SEQ:	Secuencia del primer de extensión
UP_CONF:	Puntuación de amplificación uniplex
VMS:	Síntomas vasomotores
VNTR	Polimorfismo en el número de repetición en tándem
WELL:	Número asignado al ensayo
YRI:	Yoruba en Ibadan, Nigeria

Introducción

El cáncer de mama es una de las formas más comunes de cáncer en mujeres de los países occidentales. De acuerdo con los datos de Globocan 2012, representa la patología con mayor incidencia, mortalidad y prevalencia. Una serie de factores clásicos se utilizan para determinar el riesgo individual, permitiéndole al personal médico realizar una planificación del tratamiento. Tal es el caso del sistema TNM de estadificación y el estado de los receptores hormonales (ER y PR) y de marcadores pronósticos y predictivos como el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2/neu). La desventaja de este tipo de parámetros es que deben ser evaluados en el tumor primario y no son útiles en el seguimiento.

Durante los últimos años, las investigaciones sobre el cáncer de mama han tenido como objetivo principal la identificación de variantes genéticas y epigenéticas que estén asociadas a riesgo de padecer la enfermedad, el riesgo de recurrencia o la clasificación de un subtipo molecular del tumor que permita desde el punto de vista de la farmacogenética, establecer nuevos marcadores de respuesta a tratamiento específico para determinar los procedimientos que serán los mejores para cada paciente.

De acuerdo con los algoritmos de atención y tratamiento, el Tamoxifeno es indicado especialmente para pacientes premenopáusicas, mientras que las pacientes postmenopáusicas son tratadas con Inhibidores de Aromatasa, los cuales bloquean la síntesis de estrógeno, por lo que sus niveles disminuyen y se frena el crecimiento del cáncer. Esto es así debido a que en las mujeres posmenopáusicas, los estrógenos son producidos principalmente en glándulas suprarrenales y en el tejido adiposo, mientras que en mujeres premenopáusicas el estrógeno se produce en los ovarios especialmente.

Algunas pacientes tratadas con inhibidores de aromatasa desarrollan una serie de efectos adversos como osteoporosis, dolor articular, hipercolesterolemia y riesgos cardiovasculares. Esfuerzos hacia la disminución de dichos efectos desfavorables por el uso de un tratamiento hormonal específico, se están encaminando a la identificación de variantes genéticas que se encuentren asociados con parámetros histopatológicos del tumor y que permitan la predicción de respuesta y por ende el éxito o el fracaso del tratamiento hormonal.

Las características genotípicas del gen CYP19A1, el gen de la Aromatasa, ya han sido estudiadas en muchos grupos étnicos, tales como población asiática, europea, africana y estadounidense. Aunque existen un número importante de reportes de población caucásica, las características genéticas de esta enzima, así como la distribución genotípica y alélica son desconocidas para la población colombiana.

Por este motivo se hizo necesaria una investigación que permitiera identificar los polimorfismos (SNPs) del gen de la aromatasa que se encuentran asociados a la respuesta al tratamiento hormonal en el cáncer de mama y que están en mayor frecuencia en nuestra población.

El objetivo principal de esta propuesta de investigación fue establecer las frecuencias alélicas de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen CYP19A1 implicadas en la respuesta a tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en una muestra de población colombiana, realizando adicionalmente una descripción de las características clínicas de un grupo de pacientes con cáncer de mama portadoras de las variantes genéticas estudiadas atendidas en el HOMIC.

Para este fin se realizó la identificación de los SNPs asociadas con respuesta a IA mediante una revisión detallada de la literatura científica y se examinó la mejor alternativa costo efectiva para la evaluación del mayor número de variantes, y se seleccionó la plataforma MassArray de Agena Bioscience (Sequenom), como la mejor opción de genotipificación la cual se aplicó sobre las muestras de ADN de 270 sujetos y 32 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama con el objetivo de conocer la distribución genotípica y alélica de las variantes en la población, comparándolas con las presentadas en otras poblaciones y finalmente se realizó una correlación de los datos clínicos de desenlace y el genotipo en las pacientes.

Este estudio proporciona como resultado, la identificación de las frecuencias de potenciales biomarcadores específicamente en población colombiana, que contribuyen a predecir la respuesta al tratamiento con inhibidores de aromatasa y por ende su eficacia al ser suministrado; con la posibilidad de inferir el desenlace de la enfermedad en una paciente, dependiendo del estado genético para alguno de los marcadores.

1. Justificación y planteamiento del problema

El cáncer de mama es una enfermedad con gran impacto a nivel mundial, dado que es una de las patologías con mayor prevalencia en mujeres y el cáncer con mayor tasa de mortalidad en varios países. En términos de porcentaje, al cáncer de mama se le atribuyen el 25,2% de los nuevos casos de cáncer y el 14,7% de la mortalidad. En cuanto a la prevalencia a 5 años, es la enfermedad que presenta un mayor porcentaje con el 36,4% [1-3]. Específicamente para el caso Colombiano, los datos mostrados por Pardo C. y colaboradores [4] en la incidencia y mortalidad por cáncer en Colombia 2002-2006. INC; 2010, indican valores que se encuentran dentro de la media de los datos presentados a nivel mundial por Globocan en el 2012. De acuerdo con el Ministerio de Salud, alrededor de 8,686 casos son detectados al año y cerca de 2,649 mujeres mueren, debido principalmente, a que en nuestro país el 70% de los diagnósticos son tardíos. Adicionalmente, y teniendo en cuenta los valores de los últimos años, se consideró que para el 2015, la incidencia fue de 9,500 nuevos casos [5].

De acuerdo con la práctica clínica para la detección temprana, el tratamiento integral, el seguimiento y la rehabilitación del cáncer de mama del Ministerio de Salud y Protección Social, junto con el Instituto Nacional de Cancerología ESE, [5] existen una serie de algoritmos de atención teniendo en cuenta las características de la paciente, y en donde se evidencia que si se diagnostica un cáncer de mama invasivo o no, temprano o metastásico, con tratamiento neoadyuvante o adyuvante; siempre involucra a la terapia hormonal y ésta solo se usa si se tiene la indicación, es decir, si la paciente presenta un estado positivo del receptor hormonal. En el tratamiento hormonal, el Tamoxifeno es indicado especialmente para pacientes premenopáusicas, mientras que las pacientes postmenopáusicas son tratadas con Inhibidores de Aromatasa, los cuales bloquean la síntesis de estrógeno, por lo que sus niveles disminuyen y se frena el crecimiento del cáncer. Algunas pacientes tratadas con inhibidores de aromatasa desarrollan una serie de efectos musculoesqueléticos y vasomotores adversos, por lo que la identificación de variantes genéticas que se encuentren asociadas con dichos efectos desfavorables por el uso de un tratamiento hormonal específico y que adicionalmente permitan la predicción de respuesta y por ende el éxito o el fracaso del tratamiento hormonal, son de gran importancia.

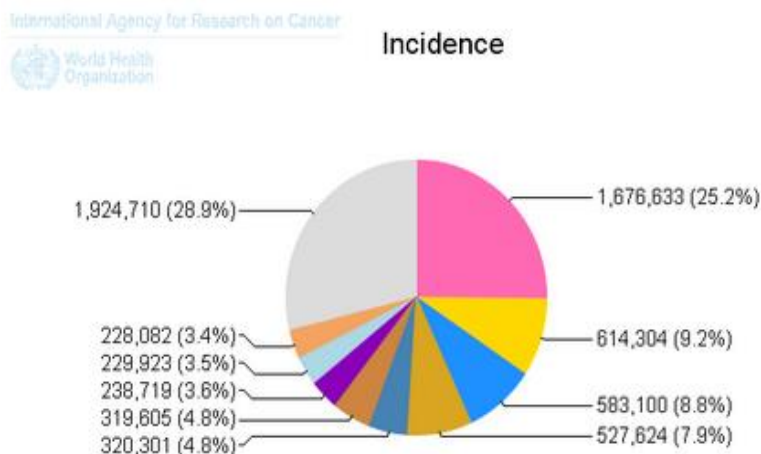
El grupo de investigación Farmacogenética del cáncer ha venido realizando estudios importantes en la identificación de variantes genéticas relacionadas con el metabolismo y la respuesta frente a distintos tipos de medicamentos, por lo que el interés es continuar con la tipificación y evaluación de polimorfismos relevantes en estos aspectos.

2.Marco teórico

2.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la forma más común de cáncer en las mujeres y es responsable de la mayoría de las muertes entre las mujeres en todo el mundo, lo que representa alrededor del 25% de todos los diagnósticos de cáncer y el 14% de las muertes relacionadas con cáncer, con casi 1,7 millones de nuevos casos y más de 500.000 muertes en todo el mundo en 2012 [1, 2, 3]. Específicamente para el caso Colombiano, los datos mostrados por Pardo C.y colaboradores de la incidencia y mortalidad por cáncer en Colombia 2002-2006. INC; 2010, [4] indican valores que se encuentran dentro de la media de los datos presentados a nivel mundial. De acuerdo con el Ministerio de Salud, alrededor de 8,686 casos son detectados al año y cerca de 2,649 mujeres mueren, debido principalmente, a que en nuestro país el 70% de los diagnósticos son tardíos. Adicionalmente, y teniendo en cuenta los valores de los últimos años, se considera que para el 2015, la incidencia aumentaría a 9,500 nuevos casos [5,6]. Las tasas de incidencia y mortalidad para cáncer de mama en el mundo y las tasas de incidencia y mortalidad en Colombia son mostradas en la Figura 2-1 y 2-2, respectivamente.

Figura 2-1. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama a nivel mundial.
Fuente: GLOBOCAN 2012 [1].



International Agency for Research on Cancer

World Health
Organization

Mortality

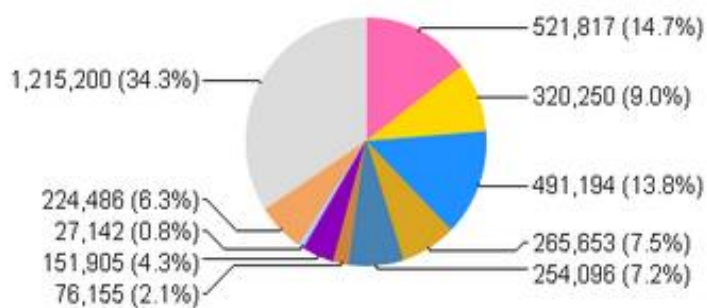
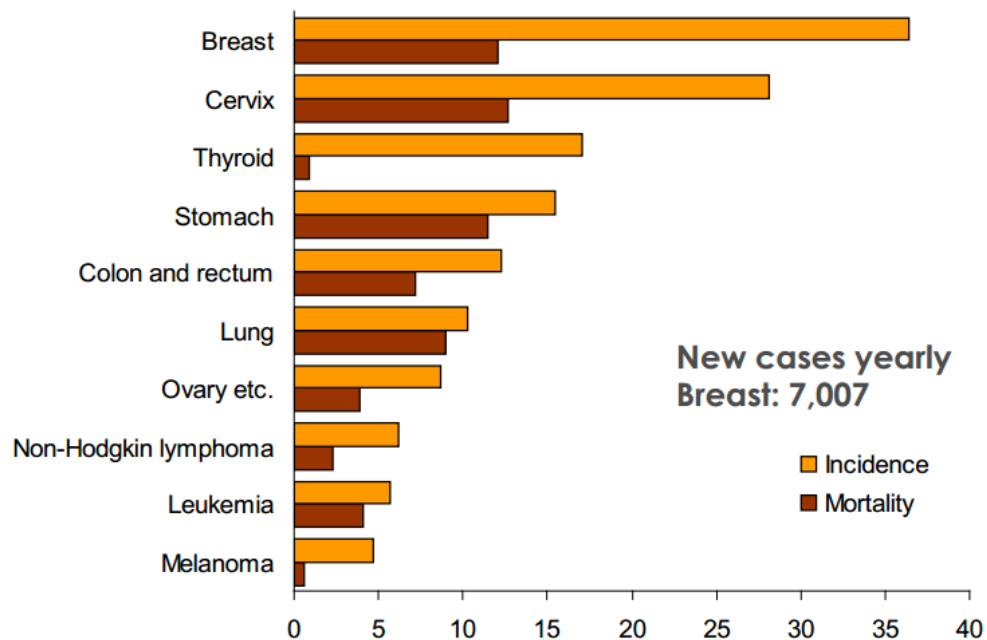


Figura 2-2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama estandarizadas por edad (ASR) en Colombia. Fuente: Pardo C et al., 2010 [4].



2.2 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama puede ser clasificado de acuerdo al tipo histológico, grado histológico y el estado del tumor de acuerdo a la clasificación TNM. El grado histológico es una valoración de diferenciación y capacidad proliferativa (índice mitótico) de un tumor y refleja su agresividad. El tipo histológico se refiere al patrón de crecimiento de los tumores y el estado a la progresión e invasividad del tumor. La diversidad histológica de los adenocarcinomas en el seno llevó a que los patólogos identificaran patrones morfológicos y citológicos específicos [7]; además de realizar perfiles inmunohistoquímicos de los tumores para receptores hormonales (receptor de estrógenos y receptor de progesterona) así como del oncogén HER2, que permiten encaminar las decisiones terapéuticas de acuerdo a la positividad o negatividad de los mismos.

2.3 Estado del receptor de estrógenos

Los cánceres de mama se clasifican sobre la base de las necesidades de crecimiento del tumor, como dependiente de estrógeno e independiente de estrógenos. Los receptores de estrógenos (ER) hacen referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17β -estradiol o estrógeno [8]. El receptor de estrógenos pertenece a una super familia de receptores nucleares (NR) los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas. Estas proteínas poseen unidades estructurales y funcionales bien definidas [9].

Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como ER α y ER β , formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente [10]. Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos intracelular transmembranal (7TMR), conocido como GPR30, que actúa de manera independiente de ER α y ER β , pero influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF), pudiendo así participar en la biología del cáncer de mama [11].

ER α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata [12].

Estos receptores, están conformados por seis dominios denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones [13]. Ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que mediante dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos [14].

La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como 17 β -estradiol (E2) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del ER), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, el cual es dependiente de ligando. La interacción con E2 activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear y muy importantemente una superficie sobre la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales [15].

Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o dependiendo del contexto celular y del promotor [16]. Por último, en la región N-terminal existen diversos sitios de fosforilación, los cuales son regulados por una variedad de proteínas cinasas [17].

El receptor de estrógenos, en ausencia de ligando, se encuentra mayoritariamente en el núcleo, en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70. Cuando se une a un estrógeno, el ER se activa, disociándose de las proteínas de choque térmico, y sufre varios cambios conformacionales para lograr la unión con sus elementos de respuesta sobre el DNA en las regiones reguladoras de genes blanco. Los receptores unidos al DNA reclutan a los factores basales de transcripción y la RNA polimerasa II por

medio de su interacción directa o por medio de proteínas intermediarias [18]. El conjunto ER-coactivador regula el acceso a la cromatina y estabilizan el complejo de preiniciación transcripcional. La transcripción de muchos genes se incrementa en presencia de estradiol, sin embargo la transcripción de otros es inhibida [19].

En su mayoría, los genes regulados positivamente están involucrados en proliferación y progresión del ciclo celular, mientras que aquellos que son regulados negativamente tienen que ver con apoptosis y regulación antiproliferativa.

2.4 Terapias Hormonales

Aproximadamente el 70% de los tumores de mama expresan ER, por lo que son candidatos para terapia antihormonal con moduladores selectivos del receptor de estrógenos. Los SERMs son ligandos antagonistas/agonistas parciales, cuya actividad depende del contexto celular y del promotor. La terapia endocrina constituye parte esencial del tratamiento tanto en el escenario adyuvante como en la enfermedad metastásica y es determinada por la expresión de los receptores de estrógenos (ER) y/o los receptores de progesterona (PR).

Al momento se cuenta con dos recursos farmacológicos para reducir el efecto del estrógeno en las células tumorales: la inhibición de la acción del estrógeno con agentes antiestrogénicos y la prevención de la producción de estrógenos por medio de la inhibición de la enzima de la aromatasa. Tamoxifeno (TAM) como adyuvante por 5 años, es el tratamiento estándar para mujeres premenopáusicas que expresen ER y/o PR. En las mujeres posmenopáusicas los inhibidores de aromatasa (IA) con o sin TAM son el nuevo estándar de manejo adyuvante [20].

TAM es un fármaco ampliamente utilizado para tratar todos los estadios de cáncer mamario en pacientes ER α positivo (ER+), así como para la prevención del cáncer en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad [21] y es uno de los agentes de tratamiento oncológico más seguro, económico, bien tolerado y ante todo efectivo, demostrado por numerosos ensayos clínicos. El tamoxifeno tiene efectos antagonistas en la glándula mamaria, pero también muestra efectos agonistas en hueso y útero, eliminando así los efectos negativos sobre hueso que tendría un antagonista completo [22].

2.5 Inhibidores de Aromatasa

Recientemente los inhibidores de la aromatasa han surgido como opciones terapéuticas relativamente novedosas para pacientes con cáncer de mama. Los inhibidores de la enzima aromatasa, bloquean la conversión de la androstenediona y testosterona en estrona y estradiol. Éstos inhiben la síntesis de estrógeno en tejido mamario, incluido las células tumorales.

El tamoxifeno por su parte inhibe el crecimiento de tumores de mama por antagonismo competitivo del estrógeno en su sitio receptor. Sus acciones son complejas, sin embargo, también tiene efectos parciales de estrógeno-agonistas. Estos efectos agonistas parciales pueden ser beneficiosos, ya que pueden ayudar a prevenir la desmineralización ósea en mujeres posmenopáusicas [23, 24], pero también perjudiciales, ya que están asociados con un mayor riesgo de cáncer uterino [25, 26] y tromboembolismo [27].

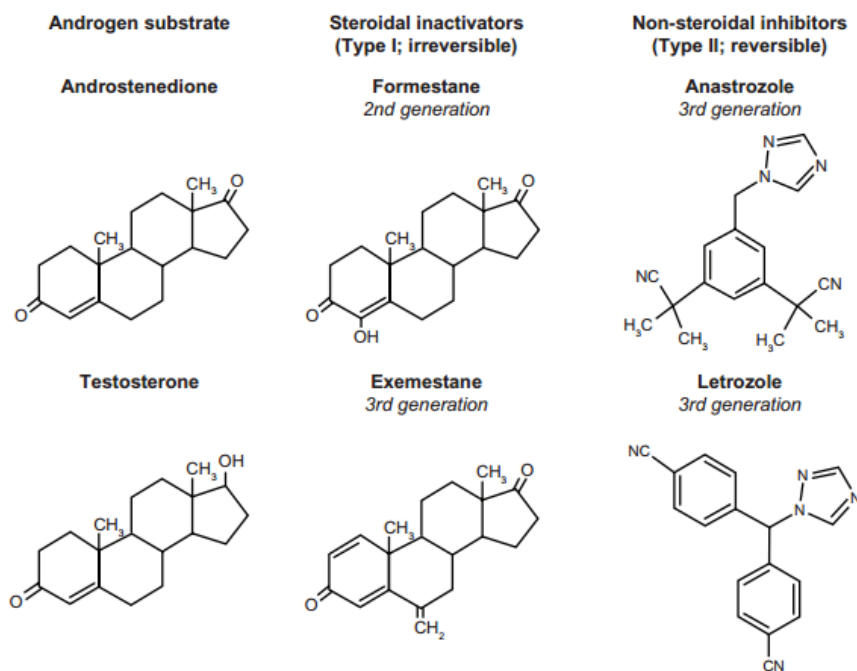
Por el contrario, los IA suprimen marcadamente los niveles plasmáticos de estrógenos en las mujeres posmenopáusicas gracias a la inhibición o inactivación de la aromatasa. La aminoglutetimida, el primer inhibidor de la aromatasa, se desarrolló inicialmente como un anticonvulsivo pero se retiró del uso después de informes de insuficiencia suprarrenal. Posteriormente, se encontró que inhibía varias enzimas del citocromo P-450 implicadas en la esteroidogénesis suprarrenal y luego se volvió a desarrollar para su uso como "adrenalectomía médica" contra el cáncer de mama avanzado. [28, 29].

Los efectos secundarios que limitaron su uso, incluían somnolencia y erupción cutánea, pero su eficacia como inhibidor de la aromatasa estimuló el desarrollo de numerosos nuevos inhibidores durante los años ochenta y principios de los noventa. Se describen como inhibidores de primera, segunda y tercera generación según el orden cronológico de su uso clínico.

Los inhibidores de aromatasa de tercera generación se clasifican en dos grupos según su mecanismo de acción: esteroides o no competitivos (exemestano) y no esteroides o competitivos (anastrozol y letrozol). Ambos tipos imitan sustratos normales (andrógenos), compitiendo con el sustrato para el acceso al sitio de unión de la enzima. Después de la unión inicial, el siguiente paso es diferente para los dos tipos: una vez que un inhibidor no competitivo se ha consolidado, la enzima inicia su secuencia típica de hidroxilación, pero la hidroxilación produce un enlace covalente irrompible con el inhibidor. La actividad

enzimática queda bloqueada de forma permanente; incluso si se elimina todo el inhibidor no unido, la actividad de la enzima sólo puede ser restaurada por la nueva síntesis de la enzima. Por otro lado los inhibidores competitivos reversiblemente se unen al sitio activo de la enzima. El inhibidor se puede disociar del sitio de unión, lo que permite una renovada competencia entre el inhibidor y el sustrato para la unión al sitio. Como resultado, la eficacia de los inhibidores competitivos depende de las concentraciones relativas y las afinidades del inhibidor y el sustrato y por tanto se requiere la presencia constante del inhibidor [30].

Figura 2-3. Estructura de andrógenos y de los inhibidores de aromatasa. Fuente: Schneider et al., 2011 [30].



Para competir por la unión al sitio activo, ambos inhibidores competitivos y no competitivos deben compartir necesariamente importantes características estructurales con el sustrato endógeno (Figura 2-3). Inhibidores no competitivos también comparten características estructurales con los andrógenos, que les permita interactuar con el residuo catalítico de la enzima, siendo inherentemente selectivo. Por el contrario, los inhibidores más competitivos interactúan con el hierro hemo, una característica común de todas las enzimas del citocromo P450. Algunos también pueden unirse al sitio de unión de

oxígeno altamente conservada además del sitio de unión a sustrato. Por lo tanto, a menos que la especificidad de un inhibidor competitivo se refuerce a través de otras características estructurales, puede bloquear la actividad de una variedad de enzimas del citocromo P450, como lo hace la aminoglutetimida.

Los tres fármacos (anastrozol, letrozol y exemestano) tienen una dosis oral al día. Las dosis diarias recomendadas son: para anastrozol, 1 mg; para letrozol, 2,5 mg; y para exemestano, 25 mg. El tiempo necesario para alcanzar la máxima supresión del estradiol es de 2 a 4 días para anastrozol y letrozol y 7 días para exemestano [31].

Los diferentes mecanismos de acción reducen resistencias cruzadas y permiten que la terapia sea prolongada utilizando diferentes inhibidores. En pacientes con un riesgo elevado de padecer cáncer de mama así como en aquellas donde la enfermedad se encuentra avanzada, los IA han demostrado buenos resultados, ya que mejora la supervivencia libre de la enfermedad y reduce las tasas de recurrencia metastásica y la incidencia de cáncer contralateral en comparación con el TAM cuando se utiliza como terapia adyuvante en mujeres posmenopáusicas con ER+ [32].

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) concluyó que la terapia adyuvante óptima para las mujeres posmenopausicas con cáncer de mama ER+ incluye un inhibidor de aromatasa, ya sea como tratamiento inicial o después de tratamiento por 2 a 3 años con el TAM [33].

Aunque se han publicado tres ensayos claves de los inhibidores de aromatasa como tratamiento de primera línea, todos ellos estudios multicéntricos y doble ciego en pacientes cuyos tumores eran receptores hormonales positivos o de estado receptor desconocido. En el estudio más grande (un estudio en el que participaron 907 mujeres, con un seguimiento medio de 18 meses), el letrozol generó mejores resultados en regresiones tumorales y se asoció con una mayor duración (9,4 vs 6,0 meses, $P = 0,0001$) [34]. Este beneficio fue significativo independientemente del tratamiento adyuvante previo con TAM o el sitio de la enfermedad.

En los otros dos ensayos, anastrozol se comparó con TAM, con resultados contradictorios. Uno de ellos demostró que el anastrozol, como el letrozol, resultó en un mayor tiempo para la progresión de la enfermedad que el TAM (11,1 frente a 5,6 meses, $P = 0,005$) y una tendencia hacia más regresiones tumorales. [35].

Mientras que el estudio de Bonnetterre et al., demostraron que el anastrozol fue tan eficaz como el TAM, pero no superior. [36].

2.6 Aromatasa

La entrada inicial de colesterol citosólico en la mitocondria, se ve facilitado por la proteína reguladora (StAR1) que representa uno de los pasos importantes para la esteroidogénesis. Corresponden a seis proteínas codificadas por genes específicos; las enzimas producidas catalizan la conversión de colesterol al estradiol biológicamente activo. La aromatasa, es una enzima que cataliza el paso final y clave, es decir, la conversión de los esteroides C19 a los estrógenos. La enzima aromatasa se localiza en el retículo endoplásmico de las células productoras de estrógeno [37]. La enzima está compuesta por dos polipéptidos. El primero es un citocromo P450 específico (P450), la aromatasa A [38]. El segundo es una flavoproteína, reductasa y es P450-NADPH citocromo ubicuamente distribuido en la mayoría de las células.

En el ser humano, la aromatasa es expresada en un número de células, incluyendo las células de la granulosa ovárica, la placenta, el sincitiotrofoblasto, la célula de Leydig testicular, y varios sitios extraglandulares [39,40].

Tras el cese de la actividad ovárica en la menopausia, la aromatasa a partir de varios tejidos extragonadales (grasa subcutánea, cerebro, hígado, hueso, tejidos endoteliales vasculares y las células mesenquimales de tejido adiposo de la mama [41]), se convierte en la enzima clave en la biosíntesis de estradiol y estrona a través de la aromatización de testosterona y androstenediona respectivamente, en particular de la grasa subcutánea. Por lo tanto, la actividad de la aromatasa periférica y los niveles plasmáticos de estrógenos se correlacionan con el índice de masa corporal en mujeres posmenopáusicas [42].

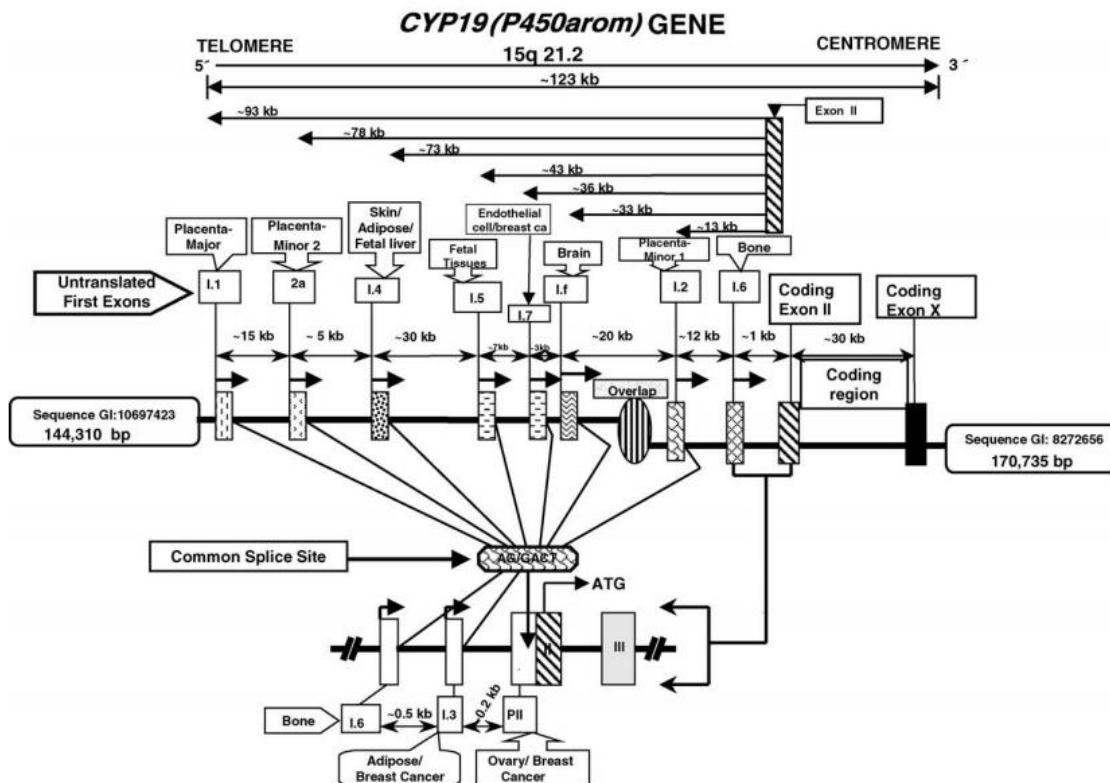
En la menopausia, los niveles plasmáticos de estradiol disminuyen de aproximadamente 110 pg por mililitro (400 pmol por litro) a niveles bajos pero estables de aproximadamente 7 pg por mililitro (25 pmol por litro). En las mujeres posmenopáusicas, sin embargo, la concentración de estradiol en el tejido del carcinoma de mama es aproximadamente 10

veces la concentración en el plasma, probablemente en parte, debido a la presencia de aromatasa intratumoral [43].

En mujeres premenopáusicas, el uso de inhibidores de la aromatasa conduce a un aumento de la secreción de gonadotropina debido a la retroalimentación reducida de los estrógenos al hipotálamo y a la pituitaria [44].

La aromatasa es un complejo enzimático del citocromo P450 que esta codificada por el gen CYP19A1 localizado en el cromosoma 15q21,2. Dicho gen (Figura 2-4) presenta una estructura compleja que se extiende por 123 Kb, 30 Kb contienen exones de codificación, correspondientes a los exones 2 al 10. Una región de 93 Kb contiene exones no codificantes tejido-específicos, con promotores separados que regulan la transcripción en diferentes células y tejidos [37,45].

Figura 2-4. El gen de la Aromatasa (CYP19A1). La expresión del gen de la aromatasa está regulada por la activación específica de tejido de un número de promotores a través splicing alternativo. Fuente: Serdar, 2005 [37]



La expresión tejido específica de la aromatasa se regula mediante el uso alternativo de estos exones. El exón 1 denominado exón I.1 es el que se usa principalmente en tejidos mamarios. Sin embargo, durante el desarrollo del cáncer a menudo se cambia del exón I.4 al exón I.2 o el exón PII, lo que causa el aumento de la expresión de la aromatasa en adipocitos y fibroblastos asociados al cáncer. El gen de la aromatasa se regula adicionalmente tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional a través de vías de señalización mediadas por receptor PKA, PKC y tirosina quinasa que emplean prostaglandina E2 y citoquinas de clase 1. Las modificaciones epigenéticas del gen de la aromatasa y la regulación de la aromatasa mediada por microRNA pueden desempeñar un papel crítico en la progresión del cáncer de mama [46].

2.7 Efectos adversos - riesgos y beneficios a largo plazo

Los inhibidores de la aromatasa de tercera generación parecen ser muy bien tolerados, con una incidencia notablemente baja de efectos adversos graves a corto plazo, lo que refleja la notable especificidad de su acción. El más común de estos efectos son los sofocos, la sequedad vaginal, el dolor musculoesquelético y el dolor de cabeza.

Algunos reportes indican que hasta el 25% de las pacientes interrumpen la terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasa debido a síntomas intolerables [47, 48].

Adicionalmente, el riesgo de importantes problemas esqueléticos a largo plazo, incluida la osteoporosis, puede aumentar con el uso de los IA. El mantenimiento de la densidad ósea depende en parte del estrógeno. El tamoxifeno reduce la desmineralización ósea a través de su efecto agonista, al menos en las mujeres postmenopáusicas, pero los IA pueden mejorar este proceso disminuyendo los niveles circulantes de estrógenos. Se ha demostrado que el uso a corto plazo del letrozol está asociado con un aumento de los marcadores de resorción ósea en el plasma y la orina [49, 50] y la terapia adyuvante con anastrozol parece estar asociada con una mayor incidencia de fracturas que la terapia con tamoxifeno.

Otros estudios indican que en el contexto clínico, 30-40% de los pacientes informan de afecciones musculoesqueléticas adversas asociados con el consumo de IA,

contribuyendo a una disminución de la función del paciente [51] y cumplimiento de la terapia, que afecta tanto a la calidad de vida como la eficacia.

El mecanismo fisiopatológico preciso de los eventos musculoesqueléticos adversos inducidos por la IA sigue sin estar claro. La marcada privación de estrógenos en los pacientes posmenopáusicos se plantea la hipótesis más cercana. Esta hipótesis se ha reforzado por el hecho de que el tiempo desde la menopausia se asocia con la incidencia de dichos eventos, con un tiempo más corto desde la última menstruación que es predictivo de más eventos adversos [52]. Además, los sofocos y sudores nocturnos, conocidos colectivamente como síntomas vasomotores (VMS), son efectos secundarios comunes asociados con la terapia endocrina, y se han relacionado con el grado de reducción de los niveles de estrógeno que se producen naturalmente durante la menopausia y artificialmente con la Quimioterapia y la terapia endocrina para el tratamiento del cáncer de mama [53].

Por otra parte, los efectos reductores de estrógenos de los inhibidores de la aromatasa pueden tener un efecto adverso sobre los lípidos sanguíneos; el estudio de Elisaf, et al. demostró un aumento en el colesterol sérico total, aumento en el colesterol de lipoproteína de baja densidad, en la apolipoproteína B y en las proporciones de riesgo de lípidos séricos para la enfermedad cardiovascular después de 16 semanas de tratamiento con Letrozol [54].

2.8 Polimorfismos en el gen de la aromatasa

El cáncer de mama ER+ exhibe una gran variabilidad de pronóstico, patrones de crecimiento histológico y resultados en el tratamiento.

Los estudios de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el gen de la aromatasa que se han realizado en los últimos años, tiene el propósito, de establecer una relación con el tumor y las características del paciente, ya que dichos polimorfismos pueden influir en el pronóstico de los pacientes de cáncer de mama no sólo al afectar el grado de exposición a estrógenos, sino también a través de una alteración en las características del tumor.

Aunque se ha informado de los polimorfismos en CYP19A1, la posible importancia funcional de la mayoría de estos polimorfismos permanece indefinida.

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

Ma et al.,[55] resecuenciaron todos los exones codificantes, los exones no traducidos, además de los sitios de splicing y una porción de la región 3'UTR no traducida del gen CYP19A1 en 240 muestras de cuatro grupos étnicos (Caucásicos CA, Afroamericanos AA, Han Chinos HCA y Mexicanos MA) e identificaron 88 polimorfismos, incluyendo 85 SNPs, 2 indels y un polimorfismo de repetición TTTA (37 y 44 SNPs presentes en Caucásicos Americanos y Mexicanos Americanos, respectivamente), que resultaron en 44 haplotipos (Figura 2-5) (Tabla 2-1), demostrando variaciones étnicas en las frecuencias.

Figura 2-5. Polimorfismos en el gen de la Aromatasa (CYP19A1).
Fuente: Ma et al., 2005 [55].

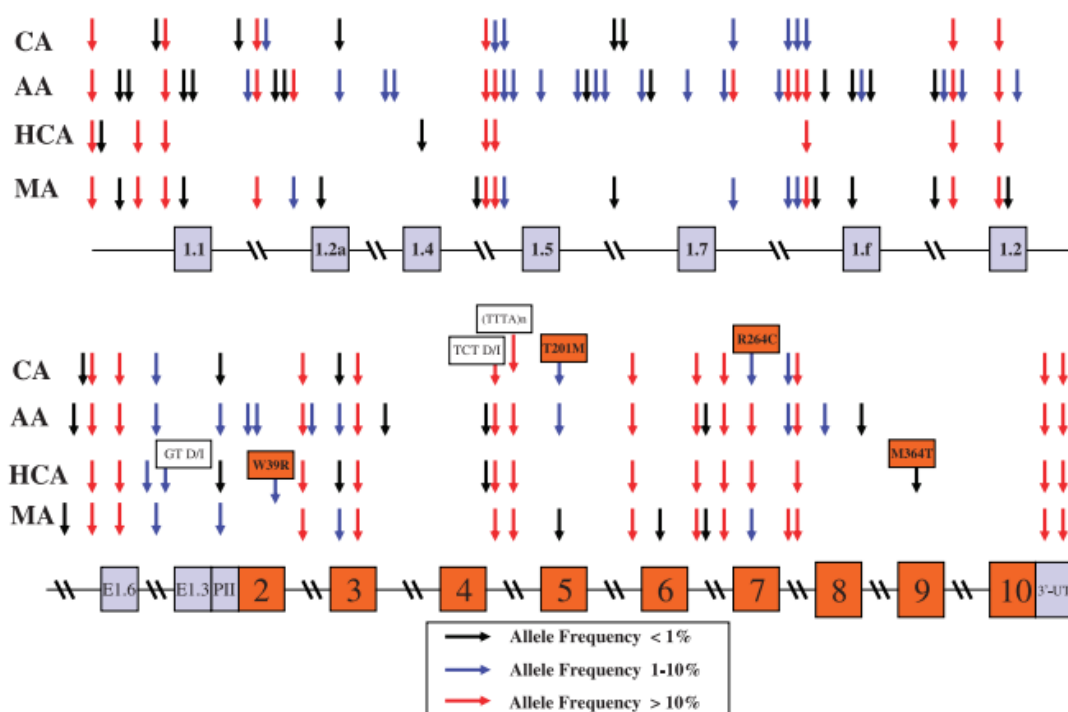


Tabla 2-1. Polimorfismos en el gen de la aromatasa (CYP19A1) Localización y frecuencias alélicas en población caucásica americana y México americana. Fuente: Ma et al., 2005 [55].

SNP-Identificación	Localización	Nucleótido	Cambio de nucleótido	Frecuencia alélica en población Caucásica Americana	Frecuencia alélica en población México Americana
rs7176005	5'-FR exon 1.1	-588	G-A	0.142	0.175
rs6493497	5'-FR exon	-144	C-T	0.158	0.158

SNP- Identificación	Localización	Nucleótido	Cambio de nucleótido	Frecuencia alélica en población Caucásica Americana	Frecuencia alélica en población México Americana
	1.1				
rs4774585	5'-FR exon 2 ^a	-468	C-T	0.175	0.300
rs936308	5'-FR exon 1.5	-628	C-G	0.867	0.875
rs1902582	5'-FR exon 1.5	-334	T-C	0.050	0.100
rs2470175	5'-FR exon 1.5	-317	G-C	0.092	0.025
rs7181886	3'-FR exon 1.7	54	G-C	0.058	0.092
	5'-FR exon 1.f	-725	G-A	0.092	0.025
	5'-FR exon 1.f	-690	A-C	0.092	0.025
rs1902586	5'-FR exon 1.f	-649	C-T	0.058	0.117
rs2008691	5'-FR exon 1.2	-596	T-C	0.125	0.108
rs1062033	Exon 1.2	-224	G-C	0.450	0.267
	5'-FR exon 1.6	-273	T-A	0.008	0.000
rs10459592	5'-FR exon 1.6	-196	A-C	0.6	0.517
rs4775936	Exon 1.6	-77	G-A	0.492	0.267
	Intron 1.6	61	C-T	0.025	0.033
	Exon PII	-83	C-A	0.008	0.025
rs3759811	Intron 2	-59	A-G	0.542	0.283
	Exon 3	186	C-T	0.008	0.003
rs700518	Exon 3	240	A-G	0.542	0.283
rs11575899	Intron 4	27	TCT(I-D)	0.333	0.417
rs60271534	Intron 4	77	(TTTA) _n		
			n=7	0.475	0.658
			n=8	0.125	0.092
			n=10	0.008	0.017
			n=11	0.342	0.200
			n=12	0.033	0.033
			n=13	0.008	0.000
	Exon 5	602	C-T; Thr ²⁰¹ Met	0.050	0.008
rs4324076	Intron 5	-16	T-G	0.530	0.317

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

SNP-Identificación	Localización	Nucleótido	Cambio de nucleótido	Frecuencia alélica en población Caucásica Americana	Frecuencia alélica en población México Americana
	Intron 6	36	A-T	0.542	0.371
rs2304463	Intron 6	-106	T-G	0.542	0.308
rs700519	Exon 7	790	C-T; Arg ²⁶⁴ Cys	0.025	0.050
rs2289105	Intron 7	26	C-T	0.100	0.225
	Intron 7	-79	A-G	0.542	0.317
rs10046	3'-UTR	1,531	C-T	0.558	0.317
rs4646	3'-UTR	1,673	G-T	0.292	0.533

Estudios de genómica funcional se realizaron con 4 polimorfismos (SNPs) que resultaron ser no sinónimos, dos de los cuales fueron reportados por primera vez. Esos SNPs alteraron los siguientes aminoácidos: rs28757184→Thr²⁰¹Met, rs700519 →Arg²⁶⁴Cys, rs2236722→Trp³⁹Arg y rs56658716→Met³⁶⁴Thr (éstos dos últimos no se presentaron en CA ni en MA).

Cys²⁶⁴ (con unas frecuencias de 0.025 y 0.050 en la muestra poblacional de CA y MA, respectivamente), junto con Thr³⁶⁴ y la doble variante Arg³⁹Cys²⁶⁴ mostraron disminuciones significativas en los niveles de actividad con el uso del inhibidor de la aromatasa y de la proteína inmunorreactiva en comparación con la enzima de tipo silvestre (WT) después de la expresión transitoria en células COS-1. Estos niveles relativos de actividad de la enzima, se correlacionan con los niveles de proteína inmunorreactiva, lo que sugiere que un mecanismo importante por el cual SNPs no sinónimos afectan a la actividad de esta enzima, es alterar el nivel de proteína enzimática. Estas observaciones indican que la variación genética en CYP19A1 podría contribuir a la variación en la fisiopatología de la enfermedad dependiente de estrógeno [55].

Posteriormente Wang et al., [56] en el 2010 secuenciaron muestras de 52 mujeres caucásicas, identificando 48 SNPs (11 SNPs más que en el estudio de Ma et al., 2005) incluyendo 4 SNPs no reportados previamente; 21 de ellos con MAF <5%.

Por otra parte, varias variantes genéticas de CYP19A1 se localizan dentro de los intrones, los cuales potencialmente pueden influir en el splicing del RNAm, lo que lleva a la disfunción de CYP19A1. La variabilidad en las frecuencias de SNPs funcionales pueden afectar multiplicidad de elementos funcionales, incluyendo potenciadores y silenciadores de splicing de intrones, que regulan el splicing alternativo y otros elementos reguladores

[57]. Varios SNP sintrónicos localizados dentro de las regiones reguladoras de CYP19A1 han demostrado influir en el riesgo de la enfermedad dependiente de estrógenos, los niveles de estrógeno en suero y / o producción de la aromatasa [58-60].

Algunos estudios han evaluado SNPs dentro de regiones intrónicas del gen CYP19A1 han determinado las frecuencias alélicas y genotípicas de SNPs funcionalmente relevantes en diferentes grupos étnicos. Starlard-Davenport et al., [61] establecieron las frecuencias alélicas de 10 SNPs candidatos a estar asociados con el riesgo de enfermedad dependiente de estrógeno, con el fin de evaluar sus distribuciones en las poblaciones de ascendencia Europea y Africana en sujetos de Arkansas. Dos de dichos SNPs, rs10459592 y rs6493497, además de presentar diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre ambos grupos étnicos, tenían implicaciones clínicas relacionadas con el cáncer de mama; el primero de ellos como predictor de eventos adversos asociados al uso de Letrozol en pacientes con cáncer de mama metastásico [62] y el segundo por estar significativamente asociado con cambios en la actividad de la aromatasa después del tratamiento con inhibidores [56].

Al comparar éstos mismos 10 SNPs ubicados dentro de regiones intrónicas en sujetos de origen caucásico versus sujetos de origen africano, y teniendo en cuenta el análisis de haplotipos, se han identificado 3 SNPs (rs10459592, rs12591359, rs12908960) que estaban en fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) [63].

Estos resultados proporcionan evidencia de las diferencias étnicas en la frecuencia de SNPs en el gen CYP19A1, por lo que incompatibilidades contribuyen a las variaciones en la incidencia del cáncer, los resultados y la respuesta farmacológica en poblaciones con diferente ascendencia.

2.9 Influencia de los polimorfismos en CYP19A1 en el tratamiento con inhibidores de Aromatasa

Los inhibidores de la aromatasa, más específicamente el anastrozol, se establece como el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas. Sin embargo, ~ 20% de las pacientes con tumores de mama con receptores hormonales positivos tratadas con anastrozol no responden y sigue siendo imposible predecir con exactitud la sensibilidad [64].

Dado que los polimorfismos en el gen de la aromatasa pueden influir en la respuesta a los fármacos inhibidores, los polimorfismos en CYP19A1 han sido investigados por su posible asociación con la eficacia terapéutica de los IA y con los niveles de hormonas sexuales o de riesgo para enfermedades dependientes de estrógeno.

Recientemente, tras la publicación de ensayos clínicos aleatorios que demuestran la eficacia de los IA en el tratamiento para el cáncer de mama, estudios adicionales han informado las asociaciones entre los polimorfismos de CYP19A1 y la respuesta clínica y/o los eventos adversos (AEs) en pacientes tratados con IA [61,65].

Teniendo en cuenta las posibles asociaciones de polimorfismos de CYP19A1 con el riesgo de cáncer de mama, los niveles de estrógeno y los niveles de actividad de la aromatasa, es posible proponer, que el genotipo del gen de la aromatasa tiene un impacto en la respuesta al tratamiento con IA y la supervivencia de los pacientes, en última instancia [66].

Algunos estudios han informado una asociación entre los polimorfismos y el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), la supervivencia global (OS) y la supervivencia libre de la enfermedad (DFS) en mujeres con cáncer de mama. En el estudio de Colomer et al., [65] en donde evaluaron la eficacia del tratamiento con letrozol en 65 pacientes Españolas con cáncer de mama HR-positivo y avanzado con respecto a dos polimorfismos localizados en el 3'UTR (rs10046 y rs4646) y uno en el intrón 2 (rs727479) de CYP19A1; los autores informaron que los pacientes heterocigóticos u homocigotos para el alelo variante rs4646 tuvieron un tiempo de progresión tres veces mayor que los del genotipo WT (525 frente a 196 días; $P = 0,02$).

Liu et al., [67] también informaron que las pacientes con la variante rs4646, presentaban TTPs significativamente más largos que las pacientes con el alelo WT (16,40 meses frente a 13,52 meses, $p = 0,049$) cuando eran tratadas con anastrozol. Adicionalmente, reportaron una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de uno o dos alelos T (C/A o A/A) para este mismo SNP y el aumento de la supervivencia global (OS) en mujeres con cáncer avanzado (37.3 meses versus 31.6 meses; $p=0.007$).

Miron et al., [68] describen un aumento significativo de OS en pacientes portadoras del alelo T en rs10046 ($p = 0,046$), y en pacientes con dos alelos T en rs727479 la respuesta terapéutica fue mejor usando en primera línea el inhibidor de aromatasa ($p = 0,040$), asociando el alelo T con una menor recurrencia local ($p = 0,047$) y el genotipo TT con

mejor supervivencia global (OS) ($p = 0,008$). Adicionalmente, las tasas de recurrencia locales se redujeron en presencia del alelo G y/o GG ($p = 0,047$) en rs700518.

Gervasini et al., [69] establecieron, a partir de un estudio en 110 pacientes Españolas, que el genotipo AA en rs727479 estaba ausente en un grupo con recaída de cáncer, pero se representó en aproximadamente el 38% de las pacientes que no presentaron recaída ($p = 0,031$).

Un estudio que investigó el impacto de rs10046 en el riesgo de cáncer de mama, la edad de inicio y la asociación con características clínicas en una población austriaca, muestra que una fracción significativamente mayor de pacientes con el genotipo TT de rs10046 desarrolla cáncer de mama antes de los 50 años (41,8% de los pacientes TT, comparado con 26,6% de los portadores C, $p = 0,018$) [70].

Estos resultados sugieren que el polimorfismo rs10046 además de tener probablemente un efecto sobre la respuesta al tratamiento, también puede tener un efecto sobre la susceptibilidad al cáncer de mama a una edad inferior a 50 años en la población investigada.

García-Casado et al., [71] examinó la PFS en mujeres Españolas posmenopáusicas tratadas con letrozol como tratamiento neoadyuvante; las pacientes que llevaban el alelo menor de rs4646 presentaron una PFS más baja que las pacientes WT ($p=0.068$), describiendo una relación entre la variante genética (AC/AA) y una pobre respuesta al tratamiento neoadyuvante con Letrozol; este efecto fue especialmente significativo en el grupo de pacientes de edad avanzada (>75 años), no operadas después del tratamiento con letrozol ($p=0.009$).

En un estudio realizado por investigadores Chinos, en 1136 pacientes asiáticas, el SNP no sinónimo, rs700519 (Arg264Cys), se asoció con la supervivencia libre de la enfermedad. El HR ajustado por edad para el genotipo Cys / Cys (T / T) fue de 2.1 (IC 95%, 1.1-3.9) para la supervivencia libre de enfermedad, en comparación con aquellos que llevan el alelo Arg (C). Por lo que las pacientes (CC)-(CT) presentaron una mayor DFS en relación a las pacientes TT, $p=0.002$. [72]

Adicionalmente, otro grupo de investigadores Chinos, realizaron un estudio que incluía 406 pacientes premenopáusicas; las mujeres homocigóticas para el alelo menor (AA) de rs4646 presentaron una DFS más larga en comparación con las que llevan el alelo mayor (CC o AC) (87 meses frente a 48,7 meses; $p = 0,041$), pero para mujeres posmenopáusicas se estimó que la DFS para la variante AA era más corta (AA frente a

AC o CC: 13,7 meses frente a 56,3 meses, HR = 2,758, IC del 95% = 1,432-5,313, $p = 0,002$) [73, 74].

Estos hallazgos sugieren que la presencia de la variante rs4646 puede ser un factor predictivo del beneficio del tratamiento de IA. Los efectos de los polimorfismos del CYP19A1 en los resultados clínicos se detectaron con mayor frecuencia en estudios individuales [75].

Los resultados de Park, et al. [62] evidencia que la presencia de los tipos homocigotos, (T/T - C/C) rs700518, (T/T - G/G) rs10459592 y (C/C - T/T) rs4775936 fueron significativamente asociados con un alto grado de beneficio clínico cuando las pacientes Coreanas fueron tratadas con letrozol.

Otro grupo de estudios han reportado asociaciones entre SNPs en el gen de la aromatasa y el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF) y la supervivencia libre de progresión (PFS). Por ejemplo, Ferraldeschi et al., [76] reportaron que pacientes portadores del alelo T rs4775936 presentaban TTF prolongados cuando se comparan con las pacientes con el alelo WT. Resultados similares se observaron con en los pacientes con más de 7 repeticiones TTTA en rs60271534 en comparación con los que poseían menos repeticiones ($p=0.012$)

Los IA parecen mostrar ciertas ventajas y unos efectos secundarios menores que los asociados a la terapia con tamoxifén, aunque también carecen de los efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo. Los principales efectos adversos de los IA no esteroideos son pérdida de masa ósea, artritis, artrosis, artralgia, fracturas, hipercolesterolemia y riesgo cardiovascular. El gen CYP19A1 se ha asociado con los procesos de homeostasis ósea en mujeres posmenopáusicas.

Además, los IA están asociados con eventos que bloquean la función ovárica provocando, por ejemplo, sofocos [77].

Fontein et al., [78] señalaron a partir de un estudio en 737 pacientes holandesas, que el genotipo homocigoto (A/A) de rs934635 se asoció con mayores probabilidades de eventos adversos musculoesqueléticos (MS-AEs). Además rs7176005 (T/T) se asoció con una mayor probabilidad de VMS, al igual que el genotipo homocigoto (T/T) de rs16964189 ($p = 0.025$ y $p = 0.021$, respectivamente).

Hernry et al., [48] observaron un aumento no significativo en MS-AEs cuando al menos ocho repeticiones de rs60271534 estaban presentes. Park et al. [62] describen una

asociación entre el haplotipo M_3_5 (que incluye los SNPs: rs12148604, rs4646, rs10046, rs700519, rs4324076, rs700518, rs3759811, rs727479, rs4775936, rs10459592, rs767199, rs10519297, rs1062033, rs2008691, rs1008805 y rs17523527) y MS-AEs (principalmente artralgia) en 66 de los 109 pacientes incluidos en ese estudio.

Por otra parte Mao et al., [79] encontraron que las pacientes Estadounidenses clasificadas como caucásicas y portadoras con al menos 7 repeticiones TTTA de la variante rs60271534 presentaron un riesgo no significativo pero mayor con un aumento de 1,7 veces en la probabilidad de presentar artralgia asociada al consumo de IA, mientras que los portadores de al menos un alelo de 8 repeticiones tuvieron un riesgo significativamente menor.

TTTA(7) se ha asociado con niveles más bajos de estrógeno en mujeres posmenopáusicas y TTTA(8) se ha asociado con niveles más altos de estrógenos [80].

Estas relaciones apoyan una posible hipótesis: las mujeres con los polimorfismos de la enzima aromatasa asociados con menores niveles de estrógeno pre-IA, sufren un mayor agotamiento de los estrógenos con la exposición al inhibidor, por lo tanto, las pone en mayor riesgo de desarrollar artralgia.

Adicionalmente, un estudio en mujeres estadounidense con el genotipo (A/A) para el rs700518 (G/A en Val80) desarrollaron pérdida ósea significativa en la columna lumbar y en la cadera a los 12 meses de tratamiento con inhibidor de aromatasa, en relación con los pacientes portadores del alelo G (G/A; G/G) ($p=0.03$), es decir, que estas pacientes presentaron un riesgo de pérdida ósea asociada a la inhibición de la aromatasa y merecieron un seguimiento cercano durante la terapia a largo plazo [81].

Aunque algunos acontecimientos adversos, como musculoesqueléticos o vasomotores, no representan en sí mismos un peligro para la vida, si representan una amenaza potencial para el resultado de una paciente a causa de un efecto adverso.

El estudio de Leyland, et al. [82] basado en el ensayo BIG 1-98 en donde participaron 8028 pacientes, indica un aumento del riesgo de AEs músculo-esqueléticas para los pacientes con variantes rs700518 CC / TC frente a TT ($p = 0,02$). Los pacientes tratados con tamoxifeno con variantes AA / CA rs4646 tuvieron un riesgo reducido de eventos adversos óseos, mientras que la presencia del alelo (C) de rs10046 se asoció con un riesgo aumentado de los eventos adversos en hueso.

Artigalás, [83] reportó a partir de un estudio con 190 pacientes Brasileñas que utilizaron IA por al menos cuatro semanas, una asociación entre el genotipo silvestre de rs10046 con menores tasas de aparición de disfunción articular ($p = 0,002$); mientras que Johansson et al., [84] establecieron que la presencia de la variante T / T de rs10046, presente en el 23% de las mujeres, se asoció con una incidencia reducida de sofocos y/o sudoración ($p = 0.03$).

Por otra parte, dos SNPs estrechamente vinculados rs6493497 y rs7176005 (ubicados en la región flanqueante 5' del exón 1,1) se han asociado significativamente con un mayor cambio en la actividad de la aromatasa después del tratamiento con los inhibidores, resultando en mayor inhibición de la actividad de la aromatasa, además de cambios en los niveles de Estrona y mayor actividad de la aromatasa en el momento basal, indicando una variación en la respuesta frente al tratamiento, ya que probablemente, el nivel basal elevado de la actividad de la enzima para dichas variantes, tendría un mayor efecto inhibitorio, que puede ser debido a la existencia de más dianas farmacológicas para la inhibición [56].

Existe una creciente evidencia de que las variantes de genes polimórficos pueden contribuir en las diferencias en los rasgos complejos entre los individuos, por lo que la evaluación de los genes implicados en el metabolismo de fármacos proporcionará información valiosa para la planificación del tratamiento. Aunque la eficacia de los IA en las pacientes con cáncer de mama se ha demostrado, existe una variabilidad significativa de la respuesta y la frecuencia con la que se presentan los eventos adversos. Por consiguiente, las pruebas que son capaces de predecir la respuesta al tratamiento y el pronóstico, serían de enorme valor en el manejo de estas pacientes [75].

3.Objetivos

3.1 Objetivo General

Establecer las frecuencias alélicas de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen CYP19A1 implicados en la respuesta a tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en una muestra de población colombiana.

3.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar los SNPs implicados en la respuesta a tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa, reportados en otras poblaciones.
2. Establecer la distribución de las frecuencias de los SNPs seleccionados en una muestra de población colombiana.
3. Comparar las frecuencias de los SNPs estudiados en población colombiana con las reportadas en otras poblaciones.
4. Describir características clínicas de un grupo de pacientes colombianas con cáncer de mama portadoras de las variantes genéticas estudiadas.

4. Metodología

4.1 Tamaño de la muestra

La determinación del tamaño muestral para obtener resultados estadísticamente significativos, de modo que permitiera establecer las frecuencias de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen CYP19A1 en población colombiana, se realizó considerando un tamaño que permitiera encontrar individuos con la variante del polimorfismo rs700518, por ser el polimorfismo más frecuente en población caucásica; para esto se tomó como referencia la frecuencia de 0.674, reportada previamente por el Proyecto de los 1000 genomas en Fase 3 para esta variante, teniendo en cuenta que las otras variables, al ser más escasas, serían difíciles de encontrar. El cálculo se realizó a través de la calculadora del tamaño de muestra disponible <http://www.mey.cl/html/samplesize.html>, para lo cual se consideró un margen de error igual a α : 5%, y un nivel de confianza del 95%. Para el tamaño de la población se tomó la cifra de población diagnosticada en el 2012, de 8.686 mujeres [1], considerando que el tamaño recomendado para la muestra del estudio permitió tener la seguridad de que las condiciones aceptadas para la generalización (confiabilidad, variabilidad y error) se mantenían.

4.2 Sujetos de estudio

La población a partir de la cual desarrolló este trabajo de tesis, consistió en 302 personas no relacionadas que fueron reclutadas entre 2013 y 2016, de la siguiente manera:

- Grupo 1: 270 sujetos, hombres y mujeres no relacionados sin cáncer de mama provenientes del estudio “*Asociación entre la presencia de polimorfismos en el metabolismo del metotrexato y su efectividad, en un grupo de pacientes colombianos con artritis reumatoide*” realizado por el Dr. Jhon Londoño y la Dra. Ana Santos de la Universidad de La Sabana. Los pacientes (450 en total) para éste estudio fueron reclutados desde Agosto del 2013 hasta Septiembre del 2016 en el Hospital Militar Central (HOMIC) y todos ellos firmaron un consentimiento informado en donde autorizaron conservar su muestra, con la posibilidad de emplearla en otros estudios de investigación.

- Grupo 2: 32 mujeres posmenopáusicas con diagnóstico de cáncer de mama en cualquiera de los estadios (In situ, localmente diseminado y/o metastásico), con receptores hormonales positivos (ER+ y/o PG+), con o sin componente familiar; que estuvieran recibiendo tratamiento hormonal neoadyuvante o adyuvante con cualquiera de los inhibidores de aromatasa de tercera generación (Letrozol, Anastrozol, Exemestano) tratadas en el Hospital Militar Central reclutadas desde Junio de 2016 a Julio del mismo año, con fechas de diagnóstico desde 1995 hasta Mayo de 2016.

Debido a que con el Grupo 2 se realizaría la descripción de las características clínicas teniendo en cuenta las variantes genéticas estudiadas, para éstas pacientes, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de exclusión: Pacientes con receptores hormonales negativos o con inmunohistoquímicas inconclusas, pacientes que estuvieran recibiendo exclusivamente Tamoxifeno o que presentaran hipersensibilidad conocida a los IA. No fueron incluidas pacientes con algún grado de parentesco con pacientes que ya hicieran parte del estudio.

Para el desarrollo de este estudio se contó con el apoyo del Laboratorio de Inmunología y el soporte de la Doctora Ana Santos y el Doctor Jhon Londoño de la Universidad de La Sabana, además de la colaboración del Doctor Luis Eduardo Pino de la Unidad de Hemato-Oncología del HOMIC.

El protocolo fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Comité de Ética de La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo A) y por la Junta del Comité de Ética del HOMIC (Anexo B). Todas las personas incluidas en este estudio firmaron un consentimiento informado antes de la toma de las muestras (Anexo C y D), donde aceptan su inclusión en el estudio y decidieron la disposición final de la muestra recolectada, en donde pudieron elegir entre descartarla, o conservarla para ser incluida en estudios posteriores, lo cual sucedió con las muestras del proyecto de artritis.

La información personal e historia familiar fue obtenida mediante entrevista. Adicionalmente, los datos clínicos e histopatológicos de los sujetos del grupo 2 fueron recolectados de las historias clínicas y de los reportes de patología. La información sobre factores de riesgo conocido y potencial se recolectó para todas las pacientes participantes

mediante el diligenciamiento de un cuestionario (Anexo E) y la información fue almacenada y codificada en una base de datos en Access diseñada para este estudio.

4.3 Selección de pacientes

Se incluyeron en el estudio las personas que manifestaron mediante firma del consentimiento informado su interés. Se realizó punción en vena periférica para la obtención de una muestra aproximada de 8 mL de sangre total, se asignó una codificación a cada una de las muestras para mantener su anonimato en la base de datos.

4.4 Recolección y Procesamiento de la Muestra:

Usando tubos vacutainer TM tapón lila con anticoagulante EDTA, se recolectaron aproximadamente 8 mL de sangre periférica en 2 tubos. Las muestras fueron luego centrifugadas durante 3 minutos a 4.500 rpm para obtener el plasma y la capa de células blancas. El plasma fue aspirado con pipeta y transferido a un tubo eppendorf de 2 mL para su almacenamiento a -80°C.

4.4.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

La extracción de ADN para los dos grupos de pacientes fue la siguiente:

- Grupo 1: Las 270 muestras del grupo proveniente de la Universidad de la Sabana, se procesaron mediante el kit UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin) de MoBio y/o el kit Wizard® Genomic DNA Purification según indicaciones del fabricante; una vez obtenido el ADN se ajustó a una concentración de 100ng/μl. Si luego de cuantificar no se alcanzaban una concentración mayor a los 60ng/ μl, el botón de células que quedaba del proceso fue sometido a extracción por el método de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y precipitación con etanol [85].
- Grupo 2: Para las 32 muestras, se realizó la extracción de ADN usando el método de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y precipitación con etanol. Detalles del protocolo empleado se muestran a continuación:

4.4.1.1 Digestión

La capa de células blancas fue cuidadosamente transferido con pipeta pasteur a un tubo falcon de 15 mL junto con 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0,14 M; KHCO_3 0,1M, EDTA 0,5 M pH=8.0) para ser lavado al menos 3 veces. Luego de descartar, se realizaron 4 lavados adicionales con 2 mL de PBS 1X cada uno.

Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C y se les agrego 450 μL de buffer de incubación (Tris 1mM pH 7.4 (1mL); EDTA1mM (2mL); NaCl 250mM (50mL); SDS 2% (20mL) Aforado a 1L) junto con 35 μL de Proteinasa K (20mg /ml) siendo incubadas por 24 horas a 56°C.

Después de lisar y eliminar los glóbulos rojos, se inactivo la proteinasa K subiendo la temperatura a 100°C por 10 minutos. El pellet de células blancas se resuspendió en 200 μL de Perclorato de Sodio 3M y luego de realizar vórtex vigorosamente por 5 segundos se agregaron 500 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1); inmediatamente se agitó por vórtex por 15 segundos para difundir ambas capas y se dejó actuar a temperatura ambiente con agitación.

4.4.1.2 Precipitación de ADN

En seguida se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase acuosa (aproximadamente 600 μL de sobrenadante) se recuperó y se transfirió a otro tubo eppendorf en donde se le adicionó un volumen aproximado de NaCl 3M en una proporción 1/10 del volumen total (alrededor de 60 μL), se agitó por inversión y subsiguientemente se adicionó Isopropanol al 100%, en una proporción de $\frac{1}{2}$ del volumen del tubo (cerca de 330 μL) el cual tenía una temperatura de -20°C, se agitó por inversión y luego dejó a -20°C por 1 hora.

Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante; el pellet de ADN se lavó con 500 μL de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar en plancha de calentamiento a 55°C hasta que el tubo quedara sin ningún rastro de etanol.

4.4.1.3 Rehidratación del ADN

Para rehidratar el ADN, el pellet se resuspendió en 50 μ L de Tris EDTA pH 7.4, luego se cuantificó.

4.4.1.4 Cuantificación de ADN

El ADN se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) usando 1 μ L de la muestra. La relación A260/A280 fue usada para evaluar la pureza del ADN, un valor entre 1,7 y 1,9 se consideró aceptable.

Las muestras de ambos grupos fueron cuantificadas conjuntamente con el kit de Qubit dsDNA BR Assay de Life Technologies, el cual, lee la concentración de ADN usando un Fluorómetro; el ensayo es altamente selectivo para ADN de doble cadena (dsDNA). Adicionalmente, se realizaron geles de agarosa para el gen de Beta globina y se comprobó la integridad. Posteriormente las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.5 Selección de SNP

Se realizó la revisión bibliográfica de los SNPs reportados en la literatura asociados a la respuesta al tratamiento con inhibidores de aromatasa, mediante el uso de las principales bases de datos tales como NCBI, EMBASE, Espacenet, FullfreePDF, Medline, Nature.com, Pubmed, Sciencedirect, LILACS y Cochrane.

En las ecuaciones de búsqueda se incluyeron, entre otros los siguientes términos:

“aromatase inhibitor”, “anastrozole”, “letrozole”, “exemestane” y adicionalmente “CYP19A1”, “aromatase gene”, “aromatase polymorphism”, “human cytochrome P450 aromatase”, “cytochrome P450 19A1”, “CYP19”.

SNPs candidatos del gen CYP19A1 se identificaron utilizando el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de genes y bases de datos de SNP (disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, visitada agosto 08, 2015). Para el momento de la consulta había 961 SNP en la base de datos, de los cuales 49 tenían una tasa de Heterocigosis > 20% y un MAF >0.05.

La información colectada fue registrada en tablas diseñadas en Excel donde se incluyó la información de la variante genética identificada en el estudio, la población evaluada, etnicidad, autor y asociación. Luego de incluir toda la información disponible en las bases de datos mencionadas anteriormente, se procedió a seleccionar las variantes a evaluar en nuestra población, teniendo en cuenta su evaluación previa en otras poblaciones y su reporte en publicaciones de alto impacto.

4.6 Genotipificación

4.6.1 Estudio de Polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

Luego de explorar las diferentes alternativas en el mercado, se encontró que pese a que la plataforma de Illumina sería la mejor opción al permitir evaluar cientos de variantes, presentó la limitante de no contar con un panel comercial que incluyera la evaluación de las variantes seleccionadas en CYP19A1; de manera que se investigó la posibilidad de diseñar un panel que si las incluyera y se concluyó que para esto se requiere un pedido mínimo de 1158 muestras, situación que por costos no podía ser realizable.

De manera que se identificó otra alternativa y se estableció que el Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) Genomic Medicine Group / Pharmacogenetics Research de la University of Santiago de Compostela a cargo del Dr. Angel Carracedo prestan el servicio de realizar la evaluación de las variantes genéticas de interés para el estudio a partir de un panel customizable.

Por lo que se realizó el envío de las muestras para su procesamiento. Para tal efecto se prepararon las muestras a un volumen 50 μ L con una concentración mínima de 100 ng/ μ L, en placas de PCR de 96 pozos. Se procedió a liofilizar las muestras mediante el equipo FreeZone 2,5 de labconco del laboratorio de Microbiología del IBUN siguiendo el protocolo del fabricante.

Mediante el uso de la plataforma MassArray de Agena Bioscience (Sequenom), se diseñó un panel ad-hoc con los 12 SNPs de interés asociados con la respuesta a los IA, junto con

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

otros 107 SNPs relacionados con Artritis y Dislipidemia, trabajados en conjunto por el grupo de investigación.

La tecnología Agena permite hasta un máximo de 40 evaluaciones en una misma reacción; pero llegar a alcanzar este número de evaluaciones de SNPs en una misma reacción no fue posible, debido a las características de los SNPs, de la región, del diseño y del tamaño del oligo en esa región. Al realizar el diseño, se formaron todas las combinaciones posibles para reducir el número de reacciones, pero en muchas ocasiones por incompatibilidades de los oligos, o debido a que no es posible diferenciar el tamaño por masas, no fue posible juntarlos en una misma reacción dos SNPs diferentes, por lo que el diseño incluyó 5 plexes o reacciones por separado que incluyeron 30, 29, 30, 26 y 4 evaluaciones de SNPs.

Este panel combina espectrometría de masas, química sensible y robusta y software avanzado de análisis de datos. La localización, posición y alelos esperados, junto con el diseño del ensayo se presentan en las Tablas 4-2 y 4-3 respectivamente. Los casos se clasificaron como homocigotos normales [tipo silvestre (WT)] o variante polimórfica (heterocigotos o homocigotos variantes).

Como control, se incluyeron un trío de muestras Coriell (Na10860, Na10861 y Na11984) con el fin de determinar si los resultados generados para estas muestras coincidían con los datos publicados.

Tabla 4-1. Localización y Alelos esperados para los polimorfismos seleccionados en el gen de la aromatasa (CYP19A1)

Gen	dbSNP	Localización	Posición en el Cromosoma GRCh38.p2	Posición en el Cromosoma GRCh37.p13	Orientación /Hebra	Alelos	Alelo ancestral
CYP19A1	rs7176005	5'FR del Exón 1.1	51339082	51631279	Fwd/Bottom	C/T	T
CYP19A1	rs6493497	5'FR del Exón 1.1	51338638	51630835	Fwd/Top	A/G	G
CYP19A1	rs1062033	Exón 1.2	51255741	51547938	Rev/Top	C/G	G
CYP19A1	rs10459592	Intron 1	51243944	51536141	Fwd/Bottom	G/T	T
CYP19A1	rs4775936	Intron 1	51243825	51536022	Fwd/Bottom	C/T	C
CYP19A1	rs727479	Intron 2	51242350	51534547	Fwd/Bottom	G/T	G
CYP19A1	rs700518	Exón 3	51236915	51529112	Fwd/Top	A/G	G

Gen	dbSNP	Localización	Posición en el Cromosoma GRCh38.p2	Posición en el Cromosoma GRCh37.p13	Orientación /Hebra	Alelos	Alelo ancestral
CYP19A1	rs700519	Exón 7	51215771	51507968	Fwd/Bottom	C/T	C
CYP19A1	rs10046	3'UTR	51210789	51502986	Fwd/Bottom	C/T	C
CYP19A1	rs4646	3'UTR	51210647	51502844	Fwd/Top	A/C	A
PIRC66	rs16964189	Intron	51202040	51494237	Fwd/Bottom	C/T	T
PIRC67	rs934635	Intron	51186580	51478777	Fwd/Top	A/G	G

Es importante aclarar que los polimorfismos rs16964189 y rs934635 evaluados por Fontein et al. [78] y catalogados por estos autores como SNPs del gen CYP19A, realmente no corresponden. En realidad son polimorfismos del gen PIRC66 (piwi-interacting RNA cluster 66), una clase distinta de pequeños ARN no codificantes que forman el complejo silenciador inducido por piRNA (piRISC) en la línea germinal de muchas especies animales protegiendo la integridad del genoma de la invasión por 'parásitos genómicos' - elementos transponibles – al silenciarlos [86].

Este gen presenta una región sobrelapante con el gen de la Aromatasa, en cuya región intrónica se encuentran dichos SNPs.

Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama

WE LL	TERM	SNP_ID	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse	Longitud del amplicón	UP_ CONF	MP_ CONF	Tm (NN)	PcGC	UEP_ DIR	UEP_ MASS
W2	iPLEX	rs7176005	ACGTTGGATGAAGTG CCTTCACTATACAGC	ACGTTGGATGTAGCACA GTTCTGATTTGG	115	96,3	69,2	45,2	27,3	F	8167,3
W5	iPLEX	rs6493497	ACGTTGGATGCCTTTG GGCCTTTTATGGAG	ACGTTGGATGGCTGAG ATTAGATCATACCC	119	97,1	86,9	47,6	31,8	F	6721,4
W3	iPLEX	rs1062033	ACGTTGGATGATCCTA GCATGTGGAAGC	ACGTTGGATGAAAGCT GTTATCAGCGGTCC	99	98,6	77,9	49,2	52,9	R	5219,4
W4	iPLEX	rs10459592	ACGTTGGATGAGCTG AAGAGGTGTAGGTTG	ACGTTGGATGTGGAGT ATGTCATCTGCCAC	111	99,5	72,1	45,7	35	F	6180
W2	iPLEX	rs4775936	ACGTTGGATGACAGTC TGATGTGCTGGTTC	ACGTTGGATGGGGATT ACAAAACCTGGCTG	97	100	69,2	45,6	41,2	F	5862,8
W1	iPLEX	rs727479	ACGTTGGATGCTCTGG AACATCTTCTCAC	ACGTTGGATGGAGTGG AATAAAGAGAAGGG	119	95,7	67	51,5	40,9	R	8029,2
W2	iPLEX	rs700518	ACGTTGGATGTGTTTC CTCTCCAGAGATCC	ACGTTGGATGCAGTGCC TGCAACTACTACA	90	98,3	69,2	49,4	40	F	7231,7
W3	iPLEX	rs700519	ACGTTGGATGCTCAGT GGCAAAGTCCATAC	ACGTTGGATGGCCATAG AAGTTCTGATAGC	104	98,5	77,9	48,2	50	F	5754,7
W4	iPLEX	rs10046	ACGTTGGATGGGATG ACACTATTGGCAAGG	ACGTTGGATGTCTGGAA CACTAGAGAAGGC	117	98,9	72,1	51,8	42,9	F	8076,3
W4	iPLEX	rs4646	ACGTTGGATGTACCTC CTATGGGTTGTCAC	ACGTTGGATGTCTCTTG TAGCCTGGTTCTC	100	100	72,1	49,9	47,4	R	5787,8
W1	iPLEX	rs16964189	ACGTTGGATGCATTCA GTGCTATTCCTATG	ACGTTGGATGGGCTATT CAGGGCCTTTTG	120	92,9	67	47,9	29,2	F	7635
W1	iPLEX	rs934635	ACGTTGGATGCCAAA ACTGTGGAACCC	ACGTTGGATGATTGGTA GAAGTCTGCTCC	110	99,6	67	47,3	47,1	R	5083,3

Tabla 4-2. Diseño para la genotipificación de los polimorfismos seleccionados en el gen de la aromatasa (CYP19A1)- Parte A.

WELL: Número asignado al ensayo; TERM: Química de terminación; SNP_ID: Referencia de la secuencia; UP_CONF: Puntuación de amplificación uniplex. Esta puntuación indica lo bien que el amplicón cumple los criterios del diseño, individualmente; MP_CONF: Puntuación de la amplificación multiplex. Esta puntuación indica lo bien que el amplicón cumple los criterios del diseño, teniendo en cuenta el resto de primers incluidos en la reacción multiplex; Tm (NN): Temperatura de melting para el primer de extensión; PcGC: Porcentaje de GC contenido en el primer de extensión; UEP_DIR: Dirección del primer de extensión; UEP_MASS: Masa del primer de extensión

SNP_ID	UEP_SEQ	EXT1_CALL	EXT1_MASS	EXT1_SEQ	EXT2_CALL	EXT2_MASS	EXT2_SEQ
rs7176005	aactaGTTTCATTAC TCATTTATTCAA	C	8414,5	aactaGTTTCATTCACTCAT TTATTCAAC	T	8494,4	aactaGTTTCATTCACTCATTTAT TCAAT
rs6493497	GCCTTTTATGGAG ATTTCAATT	A	6992,6	GCCTTTTATGGAGATTTTC ATTTA	G	7008,6	GCCTTTTATGGAGATTTTCATTT G
rs1062033	GTGGAAAAGCTCC CTGA	G	5466,6	GTGGAAAAGCTCCCTGA C	C	5506,6	GTGGAAAAGCTCCCTGAG
rs10459592	GTAGGTTGAACAA ACTTGTA	G	6467,3	GTAGGTTGAACAACTT GTAG	T	6507,1	GTAGGTTGAACAACTTGTAT
rs4775936	ggGGTTCTGCTGTG TTTT	C	6110	ggGGTTCTGCTGTGTTTT C	T	6189,9	ggGGTTCTGCTGTGTTTTTT
rs727479	ccctaTTCTCCCTTTC ACTTTGTTTCC	C	8316,4	ccctaTTCTCCCTTTCCTT TGTTTCCG	A	8356,3	ccctaTTCTCCCTTTCCTTTGTT TCCT
rs700518	ccatACTCGCATGA ATTCTCCATA	C	7478,9	ccatACTCGCATGAATTCT CCATAC	T	7558,8	ccatACTCGCATGAATTCTCCAT AT
rs700519	cCTTCTGTGGAAAT CCTGC	A	6026	cCTTCTGTGGAAATCCTG CA	G	6042	cCTTCTGTGGAAATCCTGCG
rs10046	aagaaTGATGAGAA ATGCTCCAGAGT	A	8347,5	aagaaTGATGAGAAATGC TCCAGAGTA	G	8363,5	aagaaTGATGAGAAATGCTCCA GAGTG
rs4646	CACCAAGCTAGGT GCTATT	C	6075	CACCAAGCTAGGTGCTAT TG	A	6114,9	CACCAAGCTAGGTGCTATTT
rs16964189	aATTCTTCACAGAA CTAGAAAAAAC	G	7922,2	aATTCTTCACAGAACTAG AAAAAACG	T	7962,1	aATTCTTCACAGAACTAGAAA AAACT
rs934635	CCTCAACTCACATG CAA	G	5330,5	CCTCAACTCACATGCAAC	A	5410,4	CCTCAACTCACATGCAAT

Tabla 4-2. Diseño para la genotipificación de los polimorfismos seleccionados en el gen de la aromatas (CYP19A1)- Parte B

UEP_SEQ: Secuencia del primer de extensión; EXT1_CALL: Primera variante alélica; EXT1_MASS: Masa de la secuencia del primer de extensión + genotipo de la primera variante alélica; EXT1_SEQ: Secuencia del primer de extensión + primera variante alélica; EXT2_CALL: Segunda variante alélica; EXT2_MASS: Masa de la secuencia del primer de extensión + genotipo de la segunda variante alélica; EXT2_SEQ: Secuencia del primer de extensión + segunda variante alélica

4.6.2 Estudio de Polimorfismo en el número de repetición en tándem (VNTR)

El polimorfismo rs60271534 fue genotipificado por secuenciación en ABI 3730xl en los Laboratorios de MACROGEN Inc. Para ello, se envió el producto de PCR en Tiempo Real, para su purificación y posterior secuenciación standard.

La reacción de PCR en tiempo real se realizó en el sistema LightCycler® 480 del laboratorio de Microbiología del IBUN con formato de sondas SimpleProbe diseñadas y usando como tinte fluorescente SYBR Green I. La mezcla contenía 10 µL de la master mix provista por el kit LightCycler® 480 Probes Master (N° 4707494001- Roche), 1 µL de cada uno de los primers (forward y reverse) diseñados en primer3 y Vector NTI (Tabla 4-4) 3 µL de agua y 5 µL de ADN (Tabla 4-5). Para la amplificación del segmento con el VNTR, se programó el equipo con las siguientes condiciones (Tabla 4-6) :un ciclo de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C y 10 segundos a 72°C. Cabe señalar que durante cada ensayo se incluyeron dos controles negativos: Uno que solo contenía el master mix y el agua y otro que contenía, además del master mix y el agua, los primers.

Tabla 4-3. Iniciadores empleados en la genotipificación de rs60271534 en CYP19A1

VNTR	Primers	Tamaño de producto de PCR	Referencia
<i>rs60271534*</i>	Forward: 5'- TTTTGTCTATGAATGTGCCTTTTT- 3'	152(7),156(8), 160(9),164(10), 168(11),172(12), 176(13)	(Huanget al., 2008) [87] con ajuste por diseño en Primer3
	Reverse: 5'-GAGGCGGAGGTTACAGTGAG - 3'		

* NC_000015.10:g.51227699_51227702TAAA[7][8][9][10][11][12][13]

Tabla 4-4. Mezcla de reacción empleada en la amplificación de rs60271534 en CYP19A1

Reactivos	Concentración Final	Volumen
<i>Master Mix</i>	2X	10 µL
<i>Primer Forward</i>	0.5 µM	1 µL
<i>Primer Reverse</i>	0.5 µM	1 µL
<i>ADN</i>	50 ng / µL	5 µL
<i>Agua</i>		3 µL
<i>Volumen Final*</i>		20 µL

*Cantidad por reacción

Tabla 4-5. Condiciones de PCR empleadas en la amplificación de rs60271534 en CYP19A1

Pasos	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos	Modo de análisis
<i>Denaturación Inicial</i>	94°C	10 minutos	1	Ninguna
<i>Denaturación</i>	94°C	10 segundos	40	Cuantificación
<i>Alineamiento</i>	58°C	15 segundos		
<i>Extensión</i>	72°C	10 segundos		
<i>Melting</i>	94°C	5 segundos	1	Curvas de Melting
	56°C	1 minuto		
	97°C	continuo		
<i>Enfriamiento</i>	37°C	10 segundos	1	Ninguna

Para verificar las condiciones de la amplificación, se analizaron 8 µL del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y 3 % dependiendo del tamaño de banda esperado. Para visualizar los fragmentos a través de la luz ultravioleta la

agarosa fue teñida con SYBR® Safe siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez se verificó la amplificación, el producto de PCR se sometió a secuenciación.

4.7 Estimación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas de los SNPs para el Gen CYP19A1

Una vez genotipados los SNPs y el VNTR seleccionados, se calcularon las frecuencias genotípicas por conteo directo y las frecuencias alélicas se estimaron empleando el método descrito por Hartl D. L. en 1988 [88].

Frecuencia alelo silvestre (p): $p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$

Frecuencia alelo mutado (q): $q = F_{b/b} + \frac{1}{2} F_{a/b}$

Donde; $F_{a/a}$ = Frecuencia genotipo homocigótico silvestre; $F_{b/b}$ = Frecuencia genotipo Homocigóticos mutado; $F_{a/b}$ = Frecuencia genotipo Heterocigótico.

4.8 Definición del tipo de respuesta

Aquellas pacientes del grupo 2 que presentaron una reducción en el tamaño del tumor, o una supervivencia con un tiempo hasta la progresión de la enfermedad más prolongado, fueron catalogadas como pacientes con respuesta positiva.

Aquellas pacientes que no presentaron ningún tipo de reducción en el tamaño del tumor o una supervivencia con un tiempo hasta la progresión de la enfermedad más corto, fueron catalogadas como pacientes con respuesta negativa.

Aquellas pacientes que presentaron, dolor en las articulaciones, dolor muscular, dolor de huesos, artritis, función articular disminuida u otros problemas musculoesqueléticos con al menos toxicidad de grado 3, de acuerdo con criterios del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para Eventos Adversos v3.0, es decir, cuyo eventos son muy graves y muy indeseables, que implicaron múltiples síntomas perturbadores como cirugías u

hospitalizaciones o que debieron terminar con el tratamiento dentro de los dos primeros años, fueron consideradas como pacientes con respuesta adversa.

4.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron variables binarias que reflejan el estado de positividad de los parámetros (si o no), así como el estado genotípico de cada polimorfismo (homocigoto WT/ heterocigoto / homocigoto variante)

Para comprobar si la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), se compararon las frecuencias genéticas observadas con las esperadas empleando la prueba χ^2 de bondad de ajuste. Para el análisis se empleó un grado de libertad y un $p < 0,05$ se consideró significativo.

Las diferencias en las frecuencias de los alelos entre la población del estudio y las poblaciones de diferentes etnicidad se evaluarán utilizando la prueba de Pearson, teniendo en cuenta que el coeficiente de correlación de Pearson es una medida relacionada con asociación y que ésta estadística es proporcional a la diferencia de proporciones, que para este caso, sería proporcional a la diferencia en las frecuencias alélicas [89].

La relación de las variantes SNPs y VNTR con los parámetros clínicos de respuesta tales como eventos adversos musculoesqueléticos, eventos vasomotores y cambio en el Inhibidor de Aromatasa se establecieron mediante un Análisis de Regresión con diagnóstico de covariables ajustada por edad e IMC, con el fin de medir cuán fuertemente están relacionados los polimorfismos con otros polimorfismos y cómo esta relación y/o falta de variación en las frecuencias alélicas presentadas en la muestra, afecta la estabilidad y la varianza de las estimaciones. El nivel de significancia se fijó en 5%. Todos los análisis se realizaron con SAS 14.1 para Windows [90].

4.10 Consideraciones éticas

Los protocolos y procedimientos empleados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia y el Comité de Ética de Investigación del Hospital Militar Central.

El estudio además fue realizado de acuerdo a las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, Junio de 1964), revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón, Octubre de 1975) y por la 35ª Asamblea Médica Mundial (Venecia, Italia, Octubre de 1983) (World Medical Association).

El presente estudio de investigación fue considerado como una investigación con riesgo mínimo de acuerdo con las disposiciones legales vigentes emitidas del Ministerio de la Protección Social; Artículo 11, Capítulo 1, Título II, de la Resolución 8430 de 1993. El sujeto, al ser sometido a este procedimiento de toma de muestra sanguínea se encontraba bajo los riesgos y complicaciones inherentes a este procedimiento que fueron mínimos. El consentimiento informado del estudio fue el medio por el cual se dio a conocer esta información.

5.Resultados y Discusión

5.1 SNPs Seleccionados

Se realizaron investigaciones detalladas de la literatura sobre polimorfismos de un sólo nucleótido (dbSNP) para identificar variantes en CYP19A1 que (1) tuvieran un impacto funcional en la expresión génica o actividad enzimática; (2) se asociaran con el resultado al tratamiento con los IA (3) se asociaran con TTP, OS, PFS, MS- AEs, DFS, TTF.

Se seleccionaron doce (12) SNPs del gen de la aromatasa CYP19A1 (Tabla 5-1).

Tabla 5-1. Polimorfismos en el gen de la aromatasa (CYP19A1) seleccionados para el estudio.

SNPs	Alelo	Estudio	País	Etnicidad	Nº Pacientes	IA	Tto	Asociación
rs7176005	(TT)	Fontein et al.	Holanda	Caucásica	737 posmenopáusicas	Exemestano	Adyuvante	Mayor probabilidad de VMS
	(CT)	Wang et al.	Reino Unido – Estados Unidos	Caucásica	52	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	Neoadyuvante	Mayor inhibición de la actividad de la aromatasa
rs6493497	(AG)	Wang et al.	Reino Unido – Estados Unidos	Caucásica	52	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	Neoadyuvante	Mayor inhibición de la actividad de la aromatasa
rs1062033	(C/G)	Park et al.	Corea	Asiática	109 pre y posmenopáusicas	Letrozol	Cáncer de mama Avanzado	Mayor Probabilidad de MS-AEs
rs10459592	(GG)-(TT)	Park et al.	Corea	Asiática	109 pre y posmenopáusicas	Letrozol	Cáncer de mama Avanzado	Mayor beneficio clínico
rs4775936	(CC)-(TT)	Park et al.	Corea	Asiática	109 pre y posmenopáusicas	Letrozol	Cáncer de mama Avanzado	Mayor beneficio clínico
	T	Ferraldeschi et al.	Reino Unido	Caucásica 90% Otras 10%	308	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	Cáncer de mama Avanzado	TTF prolongados
rs727479	(TT)-(GT)	Miron et al.	Italia	Caucásica	53	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	NI	Menor tasa de recurrencia-OS mayor
	(TT)	Gervasini et al.	España	Caucásica	110 posmenopáusicas	Anastrozol	NI	Menor tasa de recurrencia
rs700518	(GA)-(GG)	Miron et al.	Italia	Caucásica	53	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	NI	Menor tasa de recurrencia
	(AA)-(GG)	Park et al.	Corea	Asiática	109 pre y posmenopáusicas	Letrozol	Cáncer de mama Avanzado	Mayor beneficio clínico
	(AA)	Napoli et al.	Estados Unidos	Caucásica 80% Africana-19% Asiática-1%	97 posmenopáusicas	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	Estadios 0-III	Riesgo aumentado de AEs óseos

SNPs	Alelo	Estudio	País	Etnicidad	N° Pacientes	IA	Tto	Asociación
	(GG)-(AG)	Leyland-Jones et al.	ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica)	NI	8.028 posmenopáusicas	Letrozol vrs. Tamoxifeno	Cáncer de mama Temprano	Riesgo aumentado de MS- AEs
rs700519	T	Ma et al.	Estados Unidos	25%Caucásicas - 25%Afroamericanas -25% Han Chinas Americanas- 25% México Americanas	240	NI	NI	Disminuciones significativas en los niveles de actividad de la enzima
	(CC)-(CT)	Long et al.	China	Asiática	1136 pre y posmenopáusicas	NI	Cáncer de mama Primario	DFS mayor
rs10046	T	Miron et al.	Italia	Caucásica	53	Anastrozol, Letrozol y Exemestano	NI	OS mayor
	C	Leyland-Jones et al.	ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica)	NI	8.028 posmenopáusicas	Letrozol vrs. Tamoxifeno	Cáncer de mama Temprano	Riesgo aumentado de MS- AEs óseos
	C	Artigalás	Brasil	NI	190	Anastrozol y Letrozol	NI	Menores tasas de aparición de MS- AEs
	(TT)	Johansson et al.	Estados Unidos	Caucásica 92%	1967 premenopausicas	Exemestano vrs. Tamoxifeno	Cáncer de mama Temprano	Incidencia reducida de VMS
rs4646	(AA)-(CA)	Colomer et al.	España	Caucásica	67 posmenopáusicas	Letrozol	Cáncer de mama Avanzado	TTP mayor
	(AA)-(CA)	Liu et al.	China	Asiática	272	Anastrozol	Cáncer de mama Avanzado	TTP y OS mayores
	(AA)-(CA)	García-Casado et al.	España	Caucásica	95 posmenopáusicas	Letrozol	Neoadyuvante	PFS menor
	(AA)-(CA)	Leyland-Jones et al.	ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica)	NI	8.028 posmenopáusicas	Letrozol vrs. Tamoxifeno	Cáncer de mama Temprano	Riesgo reducido de MS- AEs óseos
	(AA)	Shao et al.	China	Asiática	406 Pre (294) y posmenopausicas (112)	NI	Estadios I-III	DFS más larga en premenopáusicas y más corta en posmenopáusicas

SNPs	Alelo	Estudio	País	Etnicidad	Nº Pacientes	IA	Tto	Asociación
rs16964189	(TT)	Fontein et al.	Holanda	Caucásica	737 posmenopáusicas	Exemestano	Adyuvante	Mayor probabilidad de VMS
rs934635	(AA)	Fontein et al.	Holanda	Caucásica	737 posmenopáusicas	Exemestano	Adyuvante	Mayor probabilidad de MS- AEs

Abreviaciones: TTP, tiempo hasta la progresión; OS, Supervivencia general; PFS, Supervivencia libre de progresión; MS- AEs, Eventos adversos músculo-esqueléticos y óseos relacionados con los inhibidores de la aromatasa; NI, No indica; DFS, supervivencia libre de enfermedad; TTF, Tiempo hasta el fracaso del tratamiento; VMS, Síntomas vasomotores

5.2 Estadística Descriptiva – Población de Estudio

De los 270 sujetos del Grupo 1, 211 eran mujeres (78,1%) y 59 eran hombres (21,9%). El rango de edad de los sujetos fue 26 – 92 años. La edad media para las mujeres fue de 61 años y para los hombres fue de 60 años.

En cuanto a la población del Grupo 2, para la identificación de las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, se revisaron las historias clínicas de los pacientes oncológicos de los últimos 4 años (desde 2013 hasta 2016), el procedimiento fue dispendioso porque el Hospital Militar Central no cuenta con las Historias Clínicas digitalizadas o en una base de datos, por lo que la primera aproximación fue seleccionar los casos de cáncer de mama y de allí hacer una segunda clasificación de acuerdo a los criterios de inclusión del proyecto.

En primera instancia se identificaron 139 casos de cáncer de mama, de los cuales, 40 cumplían con los criterios de inclusión para el estudio; de esas 40 pacientes, se pudo contactar a 32 de ellas para invitarlas a participar en el estudio. Después de la debida explicación del proyecto y del consentimiento informado, todas ellas aceptaron participar. Las muestras de sangre se obtuvieron entre el 22 de junio de 2016 y el 15 de Julio de 2016.

Los datos clínicos se recopilaban mediante una revisión exhaustiva de la nota de caso retrospectiva para complementar los datos recopilados prospectivamente.

La media de edad de las pacientes fue de 63 años, y la media de edad de diagnóstico fue de 60 años con un rango entre los 39 y 75 años. El 87.5% de los casos correspondieron a Cáncer Ductal mientras que el 12.5% restante correspondieron a casos de cáncer lobulillar, todos con receptor de estrógeno positivo y en tratamiento con Inhibidores de Aromatasa de tercera generación entre el rango del 1 de Julio del 2011 al 08 de Abril del 2016.

Todas las pacientes fueron receptores de estrógeno +; el número de pacientes receptor de progesterona + fue de 28. El estado de HER2 fue negativo en 29 casos y positivo en 3 casos.

Un 43,75% (14/32) de las pacientes habían recibido quimioterapia neoadyuvante y en el 31,25% (10/32) la quimioterapia fue administrada en el contexto de adyuvante. Ninguna de las pacientes recibió inhibidor de aromatasa en neoadyuvancia. El 46,87% (15/32) de las pacientes habían recibido la terapia endocrina con IA en primera línea, mientras que el 53,12% (17/32) recibieron el IA en segunda línea tratamiento. De estas pacientes el 41,17% (7/17) cambiaron del tamoxifeno al IA por engrosamiento endometrial, el 11,76% (2/17) por metástasis, el 17,64% (3/17) por edema de miembros y/o tromboflebitis. El motivo del cambio de las otras cinco pacientes fueron: Antecedente de trombosis venosa profunda, Cefaleas importantes e insomnio, Ooforectomía, Flushing severo o por haber completado 3 años con Tamoxifeno.

El Anastrozol fue el IA más frecuentemente administrado (87,5%; 28/32) seguido de Exemestano (9,37%; 3/32) y Letrozol (3,1%; 1/32).

Los datos de las características de las pacientes del Grupo 2 se presentan en la Tablas 5-2.

Tabla 5-2. Características y resultados clínicos de las pacientes con cáncer de mama.

Características	n	Porcentaje
<u>Edad</u>	63 años	
<60	10	31,3
60-70	15	46,9
>70	7	21,9
<u>Edad de Diagnóstico</u>	60 años (39-75)	
<u>Antecedentes de cáncer en la familia</u>		
SI	19	59,4
NO	13	40,6
<u>Tipo de Tumor</u>		
Lobulillar	4	12,5
Ductal	28	87,5
<u>Estado de ER</u>		
Positivo	32	100,0
Negativo	0	0,0
<u>ER %</u>		
10-40%	2	6,3
40-70%	3	9,4
>70%	24	75,0

Características	n	Porcentaje
NI	3	9,4
<u>Estado de PR</u>		
Positivo	28	87,5
Negativo	2	6,3
NI	2	6,3
<u>PR %</u>		
10-40%	8	25,0
40-70%	4	12,5
>70%	14	43,8
NI	2	6,3
<u>Estado de HER2</u>		
Positivo	29	90,6
Negativo	3	9,4
<u>Estadio</u>		
IA	2	6,3
IIIA	6	18,8
IIA	9	28,1
IIB	5	15,6
IIIB	4	12,5
IV	1	3,1
NI	5	15,6
<u>Neoadyuvancia</u>		
SI	14	43,8
NO	17	53,1
NI	1	3,1
<u>Radioterapia</u>		0,0
SI	26	81,3
NO	5	15,6
NI	1	3,1
<u>Quimioterapia</u>		
SI	24	75,0
NO	7	21,9
NI	1	3,1
<u>Inhibidor de Aromatasa</u>		
Anastrozol	28	87,5
Letrozol	1	3,1
Exemestano	3	9,4
<u>Linea de tratamiento</u>		

Características	n	Porcentaje
Primera	15	46,9
Segunda	17	53,1
<u>Tiempo de Consumo del IA</u>	13,7 meses (2-60 meses)	
<u>VMS</u>		
SI	15	46,9
NO	17	53,1
<u>MS- Aes</u>		
SI	15	46,9
NO	17	53,1
<u>Procedencia</u>		
Bogotá	12	37,5
Cundinamarca	4	12,5
Tolima	5	15,6
Boyacá	2	6,3
Santander	1	3,1
Huila	1	3,1
Cauca	1	3,1
Valle del Cauca	1	3,1
Norte de Santander	1	3,1
Nariño	1	3,1
Bolivar	1	3,1
Caldas	1	3,1
NI	1	3,1

5.3 Análisis Genéticos

5.3.1 Muestras procesadas y analizadas:

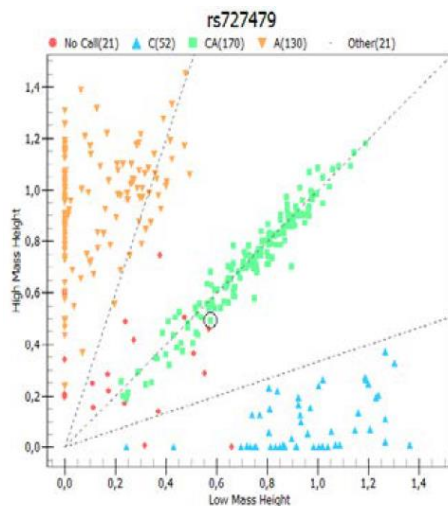
En total se procesaron alrededor de 473 muestras (Grupo 1 y 2). Del grupo 1, ciento diecisiete muestras fueron excluidas del estudio debido a que presentaban muy bajas concentraciones de ADN (<60 ng/μL) luego de intentarlo con los tres protocolos de extracción. Finalmente 356 muestras fueron usadas directamente para su genotipificación por la plataforma MassArray de Agena Bioscience (Sequenom). En términos generales el método de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1) permitió purificar ADN de buena calidad (1,8 - 2,0) y en un amplio rango de concentraciones (2914,4 ng/μL

– 7,9 ng/μL), por lo que para algunas muestras del grupo 1 proveniente del estudio de la Universidad de la Sabana, extraídas inicialmente con el kit UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin) de MoBio, y/o el kit Wizard® Genomic DNA Purification, la extracción adicional con el protocolo de Cloroformo – Alcohol isoamílico (24:1) permitió obtener mejores concentraciones.

De las 356 muestras genotipificadas, 6 no superaron los controles de calidad y 48 fueron excluidas de los resultados porque no se contaba con los datos completos para su posterior análisis, quedando un total de 302 muestras.

Para el polimorfismo rs727479, 11 muestras de las 302 finales resultaron de muy baja calidad, sin embargo las réplicas y controles realizados confirman los resultados obtenidos en las 291 muestras restantes, como se aprecia en la figura 5-1. Para el trío de muestras Coriell Na10860, Na10861 y Na11984, usadas como controles, los resultados coinciden con los datos publicados.

Figura 5-1. Cluster Agena del polimorfismo rs727479



5.3.2 Amplificación y Secuenciación del polimorfismo en el número de repetición en tándem (VNTR) rs60271534

Empleando las condiciones de PCR e iniciadores descritos en la metodología (tablas 4-4, 4-5 y 4-6) se amplificó el fragmento de ADN en el que se ubica el polimorfismo en el número de repetición en tándem (VNTR) rs60271534. Para éste polimorfismo únicamente se procesaron y analizaron las muestras correspondientes al Grupo 2, es decir, las muestras de pacientes con cáncer de mama y fue posible amplificar exitosamente el fragmento.

Los resultados de la secuenciación permitieron establecer que el 81,25 % de las pacientes (26/32) presentaron 7 repeticiones TTTA, 15,62 % (5/32) presentaron 8 repeticiones TTTA y 3,12 % (1/32) presentó 9 repeticiones TTTA.

5.3 Estimación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas para los SNPs del Gen CYP19A1

Después del conteo directo de los genotipos presentes en la población se calcularon las respectivas frecuencias genotípicas, los valores obtenidos, fueron usados para estimar las frecuencias alélicas. En la tabla 5-3 se muestran los resultados de este análisis y se registran los resultados expresados en porcentajes, calculados con respecto al total de muestras analizadas.

Las frecuencias de los alelos menores para los SNPs rs7176005 (T), rs6493497 (A), rs1062033 (G), rs10459592 (G), rs4775936 (T), rs727479 (G), rs700518 (G), rs700519 (T), rs10046 (T), rs4646 (A), rs16964189 (T) y rs934635 (A) fueron: 18.7, 18.2, 31.8, 50.8, 31.3, 40.4, 34.6, 3.1, 36.9, 46.7, 14.9 y 25 respectivamente (Tabla 5-3). Entre los SNPs estudiados, rs10459592 (50.8%) y rs700519 (3.1%) presentaron las frecuencias del alelo menor más alta y más baja, respectivamente.

Tabla 5-3. Frecuencias Genotípicas y fenotípicas observadas de los SNPs seleccionados de CYP19A1

<i>dsSNP</i>	<i>Frecuencia Genotípica Observada</i>			<i>Frecuencia Alélica Observada</i>	
	N	Tipo WT	Variantes	%	
		Homocigoto WT	Heterocigoto	Homocigoto	
<i>rs7176005</i>	302	TT: 3,6	CT: 30,1	CC: 66,2	C: 81,3 T: 18,7
<i>rs6493497</i>	302	GG: 66,9	GA: 29,8	AA: 3,3	G: 81,8 A: 18,2
<i>rs1062033</i>	302	GG: 8,3	GC: 47	CC: 44,7	G: 31,8 C: 68,2
<i>rs10459592</i>	302	TT: 22,8	TG: 52,6	GG: 24,5	T: 49,2 G: 50,8
<i>rs4775936</i>	302	CC: 46,7	CT: 44	TT: 9,3	C: 68,7 T: 31,3
<i>rs727479</i>	291	TT: 34,3	GT: 50,5	GG: 15,1	T: 59,6 G: 40,4
<i>rs700518</i>	302	GG: 12,6	AG: 44	AA: 43,4	G: 35,6 A: 65,4
<i>rs700519</i>	302	CC: 97,3	CT: 6,3	TT: 0	C: 96,9 T: 3,1
<i>rs10046</i>	302	CC: 39,4	CT: 47,4	TT: 13,2	C: 63,1 T: 36,9
<i>rs4646</i>	302	CC: 28,5	CA: 49,7	AA: 21,9	C: 53,3 A: 46,7
<i>rs16964189</i>	302	CC: 71,9	CT: 26,5	TT: 1,7	C: 85,1 T: 14,9
<i>rs934635</i>	302	GG: 56,3	AG: 37,4	AA: 6,3	G: 75 A: 25

Para establecer si los genotipos presentes en la población se ajustaban al equilibrio Hardy-Weinberg, las frecuencias genotípicas observadas se compararon con las esperadas usando una prueba X^2 . Los resultados se muestran en la tabla 5-4 y sugieren que todos los genotipos están en equilibrio.

Tabla 5-4. Resultados Prueba X^2 – Equilibrio de Hardy- Weinberg

SNP	Alelos	Frecuencia del alelo mayor	HWE valor p
rs7176005	C/T	81,6	1,00
rs6493497	G/A	82,2	0,86

SNP	Alelos	Frecuencia del alelo mayor	HWE valor p
rs1062033	C/G	67,4	0,33
rs10459592	G/T	52,2	0,59
rs4775936	C/T	67,7	0,71
rs727479	A/C	60,9	0,91
rs700518	T/C	64,6	0,20
rs700519	G/A	96,8	1,00
rs10046	G/A	62,9	0,73
rs4646	C/A	52,9	0,91
rs16964189	T/C	86,1	0,65
rs934635	G/A	74,6	0,78

*Si $p > 0,05$ se concluye que las frecuencias observadas se ajustan a las esperadas y por tanto se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

5.4 Comparación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas para el Gen CYP19A1

Luego de obtener y analizar los genotipos y las frecuencias alélicas, se compararon con lo reportado para otros grupos étnicos (Tabla 5-5); se compararon las frecuencias alélicas de las variantes de CYP19A1 entre los participantes del presente estudio y las poblaciones del HapMap según la base de datos Entrez del NCBI, además de algunas de las 26 diferentes etnias de la Fase 3 del Proyecto de los 1000 genomas ASW (en donde se incluyó el grupo de 94 Colombianos de Medellín) y los datos reportados por Starlard-Davenport et al. [61].

Tabla 5-5. Comparación de las frecuencias genotípicas y fenotípicas de SNPs de CYP19A1 en varias poblaciones.

Frecuencias Genotípicas y alélicas en distintas poblaciones							Test de Pearson - Diferencias de Proporciones		
SNP	Población	F. Genotípica			F. Alélica		Valor	Límites de Confianza	
		CC	CT	TT	C	T			
rs7176005		CC	CT	TT	C	T			
	COL(302) ^a	66,2	30,1	3,6	81,3	18,7			
	EAS(504) ^c	63,5	32,3	4,2	79,7	20,3	0,016	-0,04027615	0,07227615
	SAS (489) ^c	54,6	36,4	9	72,8	27,2	*0,085	0,025928799	0,1440712
	EUR(503) ^c	72,2	25,8	2	85,1	14,9	-0,038	-0,09187225	0,01587225
	AFR(661) ^c	28,6	47,8	23,6	52,5	47,5	*-0,288	-0,34616449	-0,22983551
	AMR(347) ^c	63,7	32	4,3	79,7	20,3	-0,016	-0,07703236	0,04503236
	CLM (94) ^c	70,2	24,5	5,3	82,4	17,6	0,011	-0,07765934	0,09965934
rs6493497		AA	AG	GG	A	G	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	3,3	29,8	66,9	18,2	81,8			
	CEU(224) ^b	1,8	25,9	72,3	14,7	85,3	0,046	-0,01522814	0,10735205
	YRI(226) ^b	8,8	39	52,2	28,3	71,7	*0,101	0,027906135	0,17409387
	HCB(86) ^b	4,6	32,6	62,8	20,9	79,1	0,027	-0,06932342	0,12332342
	JPT(170) ^b	3,5	32,9	63,6	20	80	0,018	-0,056224	0,092224
	GIH(176) ^b	6,8	25	68,2	19,3	80,7	0,011	-0,06175443	0,08375443
	MEX(100) ^b		24	76	12	88	-0,062	-0,13913814	0,01513814
	AA(96) ^d	3,1	40,6	56,3	23,4	76,6	-0,052	-0,14721657	0,04321657
	EA(270) ^d	3,3	22,6	74,1	14,6	85,4	-0,036	-0,09656128	0,02456128
	AMR(347) ^c	3,2	30,5	66,3	18,4	81,6	-0,002	-0,06163119	0,05763119
	CLM(94) ^c	3,2	22,3	74,5	14,4	85,6	0,038	-0,04525317	0,12125317
rs1062033		CC	CG	GG	C	G	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	44,7	47	8,3	68,2	31,8			
	CEU(226) ^b	28,3	45,2	26,5	51	49	-0,067	-0,14461083	0,00971604
	YRI(226) ^b	0,8	13,3	85,9	7,5	92,5	*0,607	0,54424743	0,66975257
	HCB(86) ^b	30,2	48,9	20,9	54,7	45,3	*0,135	0,017411583	0,25258842
	JPT(172) ^b	16,3	40,7	43	36,6	63,4	*0,316	0,226545364	0,40545464
	GIH(176) ^b	14,8	37,5	47,7	33,5	66,5	*0,347	0,25970127	0,43429873
	MEX(98) ^b	6,1	51	42,9	31,6	68,4	*0,366	0,260825103	0,4711749
	AMR(347) ^c	52,2	40,9	6,9	72,6	27,4	0,044	-0,02643338	0,11443338
	CLM(94) ^c	50	43,6	6,4	71,8	28,2	0,019	-0,09671907	0,13471907

		GG	GT	TT	<u>G</u>	T	Valor	Límites de Confianza	
rs10459592	COL(302) ^a	24,5	52,6	22,8	50,8	49,2			
	CEU(226) ^b	40,7	39,8	19,5	60,6	39,4	0,054	-0,02553778	0,13398824
	YRI(226) ^b	9,7	34,5	55,8	27	73	*-0,238	-0,31880489	-0,15719511
	HCB(86) ^b	25,6	46,5	27,9	48,8	51,2	-0,02	-0,13974891	0,09974891
	JPT(172) ^b	16,3	44,2	39,5	38,4	61,6	*-0,124	-0,21632737	-0,03167263
	GIH(176) ^b	25	53,4	21,6	51,7	48,3	0,009	-0,08389516	0,10189516
	MEX(100) ^b	26	52	22	52	48	0,012	-0,10099329	0,12499329
	AA(121) ^d	16,5	43,8	39,7	38,4	61,6	*0,124	0,011551985	0,23644801
	EA(263) ^d	32,3	48,3	19,4	56,5	43,5	0,057	-0,02470677	0,13870677
	AMR(347) ^c	24,2	52,7	23,1	50,6	49,4	0,002	-0,07511306	0,07911306
	CLM(94) ^c	23,4	51,1	25,5	48,9	51,1	0,019	-0,09671907	0,13471907
rs4775936		CC	CT	TT	C	<u>I</u>	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	46,7	44	9,3	68,7	31,3			
	CEU(226) ^b	25,7	42,5	31,8	47	53	*-0,096	-0,1738598	-0,01969011
	YRI(226) ^b	88,5	10,6	0,9	93,8	6,2	*-0,251	-0,31202229	-0,18997771
	HCB(86) ^b	27,9	46,5	25,6	51,2	48,8	*0,175	0,057119523	0,29288048
	JPT(172) ^b	40,7	43	16,3	62,2	37,8	0,065	-0,0247111	0,1547111
	GIH(176) ^b	40	44	16	62	38	0,067	-0,02175542	0,15575542
	MEX(100) ^b	44	48	8	68	32	0,007	-0,09832911	0,11232911
	AMR(347) ^c	51,3	40,6	8,1	71,6	28,4	0,029	-0,04161391	0,09961391
	CLM(94) ^c	50	41,5	8,5	70,7	29,3	0,02	-0,08583365	0,12583365
rs727479		GG	GT	TT	<u>G</u>	T	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	15,1	50,5	34,4	40,4	59,6			
	CEU(226) ^b	13,3	37,2	49,5	31,8	68,2	*0,133	0,055783434	0,21141666
	YRI(226) ^b	6,2	35,4	58,4	23,9	76,1	*-0,165	-0,24418378	-0,08581622
	HCB(90) ^b	6,7	35,5	57,8	24,4	75,6	*-0,16	-0,26685609	-0,05314391
	JPT(172) ^b	10,5	32,6	56,9	26,7	73,3	*-0,137	-0,22418376	-0,04981624
	GIH(176) ^b	10,2	38,7	51,1	29,6	70,4	*-0,108	-0,1959025	-0,0200975
	MEX(100) ^b	16	40	44	36	64	-0,044	-0,15367809	0,06567809
	AMR(347) ^c	12,1	51,6	36,3	37,9	62,1	0,025	-0,05105328	0,10105328
	CLM(94) ^c	19,1	43,6	37,3	41	59	-0,006	-0,12029869	0,10829869
rs700518		AA	AG	GG	A	<u>G</u>	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	43,4	44	12,6	65,4	34,6			
	CEU(226) ^b	18,6	46,9	34,5	42	58	*-0,093	-0,17098278	-0,01509237
	YRI(226) ^b	77	20,4	2,6	87	13	*-0,216	-0,28528763	-0,14671237

	HCB(86) ^b	23,2	46,5	30,3	46,5	53,5	*0,189	0,070717881	0,30728212
	JPT(172) ^b	40,7	43	16,3	62,2	37,8	0,032	-0,05850536	0,12250536
	GIH(176) ^b	43,2	42	14,8	64,2	35,8	0,012	-0,076853	0,100853
	MEX(100) ^b	40	50	10	65	35	0,004	-0,10378527	0,11178527
	AMR(347) ^c	47	42,9	10,1	68,4	31,6	0,03	-0,04260279	0,10260279
	CLM(94) ^c	45,7	44,7	9,6	68,1	31,9	0,027	-0,08142584	0,13542584
rs700519		CC	CT	TT	C	<u>I</u>	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	93,7	6,3		96,9	3,1			
	CEU(224) ^b	93,7	6,3		96,9	3,1	0,00052	-0,02914652	0,03019253
	YRI(226) ^b	62,5	32,1	5,4	78,6	21,4	*0,183	0,126068786	0,23993121
	HCB(86) ^b	76,7	23,3		88,4	11,6	*0,085	0,014554658	0,15544534
	JPT(172) ^b	59,3	26,7	14	72,7	27,3	*0,242	0,172236752	0,31176325
	GIH(174) ^b	71,3	25,3	3,4	83,9	16,1	*0,13	0,072290419	0,18770958
	MEX(98) ^b	98	2		99	1	-0,021	-0,04861163	0,00661163
	AMR(347) ^c	92,8	6,6	0,6	96,1	3,9	-0,008	-0,03623134	0,02023134
	CLM(94) ^c	93,6	6,4		96,8	3,2	-0,001	-0,04159534	0,03959534
rs10046		CC	CT	TT	C	<u>I</u>	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	39,4	47,4	13,2	63,1	36,9			
	CEU(226) ^b	19,5	47,8	32,7	43,4	56,6	-0,061	-0,14047954	0,0165428
	YRI(226) ^b	67,3	31,9	0,8	83,2	16,8	*-0,201	-0,27405877	-0,12794123
	HCB(86) ^b	11,6	58,2	30,2	40,7	59,3	*0,224	0,106771917	0,34122808
	JPT(168) ^b	28,6	50	21,4	53,6	46,4	*0,095	0,00236283	0,18763717
	GIH(176) ^b	42	48,9	9,1	66,5	33,5	-0,034	-0,12245405	0,05445405
	MEX(98) ^b	32,6	53,1	14,3	59,2	40,8	0,039	-0,07163558	0,14963558
	AMR(347) ^c	43,8	43,5	12,7	65,6	34,4	0,025	-0,04889139	0,09889139
	CLM(94) ^c	43,6	43,6	12,8	65,4	34,6	0,023	-0,08749516	0,13349516
rs4646		AA	AC	CC	<u>A</u>	<u>C</u>	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	21,9	49,7	28,5	46,7	53,3			
	CEU(226) ^b	4,5	38	57,5	23,4	76,6	*0,259	0,184603064	0,33506741
	YRI(226) ^b	9,7	47,8	42,5	33,6	66,4	*-0,131	-0,21441701	-0,04758299
	HCB(89) ^b	6,6	40	53,4	26,6	73,4	*-0,201	-0,31002911	-0,09197089
	JPT(172) ^b	5,8	40,7	53,5	26,2	73,8	*-0,205	-0,29180664	-0,11819336
	GIH(176) ^b	14,7	55,7	29,6	42,6	57,4	-0,041	-0,13321312	0,05121312
	MEX(100) ^b	20	52	28	46	54	-0,007	-0,11973131	0,10573131
	AMR(347) ^c	23,1	48,4	28,5	47,3	52,7	-0,006	-0,08297866	0,07097866

	CLM(94) ^c	12,8	57,4	29,8	41,5	58,5	0,052	-0,06240082	0,16640082
rs16964189		CC	CT	TT	C	I	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	71,9	26,5	1,7	85,1	14,9			
	CEU(226) ^b	64,6	31,9	3,5	80,5	19,5	-0,027	-0,08911136	0,03510878
	YRI(226) ^b	62,8	33,6	3,6	79,6	20,4	0,055	-0,01112889	0,12112889
	HCB(86) ^b	74,4	25,6		87,2	12,8	-0,021	-0,10223157	0,06023157
	JPT(172) ^b	69,8	25,6	4,6	82,6	17,4	0,025	-0,04471798	0,09471798
	GIH(176) ^b	58	37,5	4,5	76,7	23,3	*0,084	0,009746909	0,15825309
	MEX(100) ^b	74	24	2	86	14	-0,009	-0,08798106	0,06998106
	AMR(347) ^c	72,7	23,3	4	84,3	15,7	-0,008	-0,06348046	0,04748046
	CLM(94) ^c	66	29,7	4,3	80,9	19,1	-0,042	-0,13103682	0,04703682
rs934635		AA	AG	GG	A	G	Valor	Límites de Confianza	
	COL(302) ^a	6,3	37,4	56,3	25	75			
	CEU(224) ^b	1,8	28,6	69,6	16,1	83,9	*0,102	0,036079671	0,16827015
	YRI(226) ^b	0,9	15	84,1	8,4	91,6	*-0,166	-0,22676903	-0,10523097
	HCB(90) ^b		2,2	97,8	1,1	98,9	*-0,239	-0,2925813	-0,1854187
	JPT(170) ^b		2,3	97,7	1,2	98,8	*-0,238	-0,2895065	-0,1864935
	GIH(176) ^b	1,1	31,8	67,1	17	83	*-0,08	-0,15392379	-0,00607621
	AMR(347) ^c	5,2	36,6	58,2	23,5	76,5	0,03	-0,03545767	0,09545767
	MEX(100) ^b	2	40	58	22	78	-0,015	-0,1113898	0,0813898
	CLM(94) ^c	3,2	40,4	56,4	23,4	76,6	0,016	-0,08253985	0,11453985

Abreviaciones: CEU: Residentes de Utah con ascendencia de Europa del Norte y Occidente; YRI: Yoruba en Ibadan, Nigeria; HCB: Han Chino en Japón, Beijing y China; JPT: japoneses en Tokio, Japón; GIH: indios de Gujarat en Houston, Texas; ASW: Proyecto de los 1000 Genomas; MEX: residentes con ascendencia mexicana en Los Ángeles, California; CLM: Colombianos de Medellín; AFR: Africano; AMR: Mezcla de Americanos; EAS: Asia Oriental; EUR: Europea; SAS: Asia meridional AA: Afroamericanos; EA: Americanos Europeos

a Colombianos en el presente estudio

b Datos de HapMap según la base de datos de NCBI Entrez

c 1000 Genomas ASW

d Starlard-Davenport et al. [61]

MAF (en negrilla)

* Diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado para otros grupos étnicos, se encontró una similitud en las frecuencias alélicas de los 12 SNPs, con los grupos de los americanos y colombianos, descritas en la Fase 3 del Proyecto de los 1000 genomas. Es importante aclarar que dentro del grupo de los americanos, más específicamente los

Latinoamericanos, el Proyecto ASW incluye 64 residentes de los Ángeles USA con ancestría Mexicana, 85 Peruanos de Lima, 104 Puertorriqueños y 94 Colombianos de Medellín.

Para el grupo de entre 98 y 100 Mexicanos del HapMap se identificó una similitud en la distribución de las frecuencias de 11 de los 12 SNPs. Para el SNP rs1062033, se encontró una diferencia significativa.

En cuanto a los grupos de ascendencia africana, se evidenciaron diferencias significativas en las frecuencias de 10 de los 12 polimorfismos; seguidos por los grupos étnicos de la región de Asia Oriental, en donde se observaron diferencias en 9 SNPs y finalmente los grupos de Asia Meridional, con diferencias significativas en las frecuencias alélicas con respecto a la población del presente estudio en 6 SNPs.

Para el SNP rs16964189, únicamente se identificó una diferencia significativa de la frecuencia en la población GIH del HapMap correspondiente a indios de Gujarat residentes en Houston y para el polimorfismo rs6493497 exclusivamente se observó una diferencia significativa con la población YRI del HapMap, correspondiente a sujetos de Yoruba en Ibadan, Nigeria; es importante tener en cuenta que al comparar éste mismo SNP, con otro grupo de ascendencia Africana procedente del estudio de Starlard-Davenport et al. [61], dicha diferencia no fue identificable.

Para el caso de los SNP rs727479, rs1062033, rs700519, rs10046 y rs4646 se observó una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias alélicas entre las muestras de Colombianos analizadas en este trabajo, con respecto a las poblaciones con ascendencia Africana y Asiática. Para estos últimos tres SNPs no se encontró diferencia con la población de ascendencia Europea.

Para los polimorfismos rs10459592 y rs1062033 el alelo G considerado como el menos frecuente debido a ser la variante y no el ancestral, presenta en algunas poblaciones frecuencias por encima del 50%. De hecho el rs10459592 presentó una frecuencia alélica del 50,8% en la población colombiana de éste estudio.

El presente estudio es el primero en informar la frecuencia de los polimorfismos del gen CYP19A1 farmacológicamente relevantes en población colombiana con un tamaño de muestra mayor a lo reportado por el proyecto de los 1000 genomas ASW.

Aunque no se evidenciaron diferencias significativas con la población de 94 colombianos de Medellín, se constituye como una muestra mucho más representativa de la población colombiana por encontrarse en ella personas de diferentes regiones del país.

5.5 Descripción de características clínicas del grupo de pacientes colombianas con cáncer de mama portadoras de las variantes genéticas estudiadas.

Debido a que en el grupo de las 32 pacientes con cáncer de mama, ninguna consumió el IA como tratamiento neoadyuvante y adicionalmente, el presente estudio no tenía como objetivo realizar un seguimiento, por tanto, no se evaluó el TTP, la PFS, la DFS, ni el TTF.

Los parámetros clínicos de respuesta tales como eventos adversos musculoesqueléticos, eventos vasomotores y cambio en el Inhibidor de Aromatasa, fueron evaluados teniendo en cuenta las historias clínicas de las pacientes, así como el cuestionario que diligenciaron el día de la toma de la muestra. Su relación con el estado de los polimorfismos se estableció mediante un Análisis de Regresión con diagnóstico de covariables, que en primera instancia, excluyó del modelo únicamente la variable rs700519 (Tabla 5-6) debido a que fue un polimorfismo que mostró muy poca variación ya que en el grupo de pacientes no se identificó la presencia de la variante en estado homocigoto ni heterocigoto.

Tabla 5-6. Diagnóstico de Covariabilidad

Collinearity Diagnostics (intercept adjusted)																	
Number	Eigenvalue	Condition Index	Proportion of Variation														
			IMC	EDA	rs10046	rs104595	rs106203	rs169641	rs4646	rs477593	rs649349	rs700518	rs700519	rs717600	rs727479	rs934635	rs602715
1	3.24528	1.00000	0.00193	0.00099984	0.01321	0.01583	0.00685	0.00066161	0.01547	0.01114	0.00178	0.00628	0	0.00084895	0.01370	6.39314E-7	0.00433
2	2.06983	1.25216	0.04345	0.03589	0.00159	0.00249	0.02081	0.04246	0.00017696	0.00002049	0.02254	0.00192	0	0.00615	0.00229	0.01535	0.02745
3	1.90739	1.30439	0.00851	0.00375	0.00780	0.02489	0.00955	0.00042268	0.01006	0.00905	0.02382	0.01559	0	0.04490	0.00095811	0.00000126	0.00891
4	1.51214	1.46498	0.01338	0.00142	0.01326	0.00217	0.00180	0.04519	0.00323	0.00700	0.01365	6.980044E-8	0	0.00282	0.02617	0.14975	0.02630
5	1.13911	1.68788	0.09730	0.15496	0.00145	0.00328	0.00688	0.00709	0.01190	3.60455E-7	0.00007194	0.00044534	0	0.04870	0.09866	0.02166	0.00614
6	0.98927	1.81121	0.02290	0.00053738	0.00798	0.00272	0.00377	0.03770	0.07416	0.00063783	0.17166	0.00003286	0	0.01024	0.03936	0.01059	0.05458
7	0.89659	1.90252	0.07956	0.28663	0.00154	0.01321	0.00131	0.01331	0.01487	0.00812	0.00077044	0.00906	0	0.00002697	0.01234	0.00306	0.16402
8	0.69973	2.15358	0.23357	0.00005954	0.00098194	0.03842	0.05430	0.01526	0.00638	0.01016	0.00152	0.00004405	0	0.12021	0.00159	0.09211	0.07436
9	0.49544	2.55936	0.00773	0.20340	0.04445	0.34619	0.01969	0.01398	0.00691	0.00657	0.12985	0.00145	0	0.00697	0.05965	0.01317	0.03849
10	0.37433	2.94442	0.19717	0.09190	0.12950	0.09579	0.03439	0.02668	0.03545	0.01343	0.03951	0.00173	0	0.00614	0.22389	0.20458	0.08363
11	0.25055	3.59901	0.00590	0.02887	0.05526	0.03232	0.14107	0.00816	0.50026	0.06290	0.20354	0.00163	0	0.09925	0.10802	0.13302	0.07922
12	0.23301	3.73199	0.22379	0.00345	0.08630	0.03108	0.10135	0.53157	0.03494	0.05767	0.00114	0.00478	0	0.02293	0.20420	0.29367	0.18078
13	0.10698	5.50785	0.00492	0.00000295	0.41858	0.33773	0.07800	0.25616	0.00280	0.57320	0.16365	0.16258	0	0.43991	0.04306	0.01433	0.12295
14	0.08037	6.35436	0.05988	0.18811	0.21810	0.05389	0.52022	0.00138	0.28339	0.24009	0.22648	0.79446	0	0.19092	0.16614	0.04871	0.12885
15	1E-12	1801466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00000	0	0	0	0

Debido a que el índice de condición de los otros polimorfismos fue menor a 10, se consideró que no hubo dependencias débiles que pudieran afectar la regresión, por lo que fueron considerados entonces como variables independientes que fueron ingresadas en el modelo.

Una vez se corrió el análisis de Regresión del conjunto de los 12 polimorfismos restantes (11 SNPs y 1 VNTR), ningún efecto alcanzó el nivel de significación 0.05, es decir, que las variables evaluadas en una primera instancia no están relacionadas con los lineamientos.

Al incluir en el modelo cada polimorfismo individualmente se identificó, aunque sin los suficientes argumentos estadísticos, que potencialmente el polimorfismo rs60271534 podría llegar a estar asociado con la respuesta al tratamiento, debido a que las pacientes con 8 (5 pacientes) y 9 (1 paciente) repeticiones del polimorfismo rs60271534 (Tabla 5-7) no reportaron efectos adversos vasomotes.

Tabla 5-7. Relación en el número de repeticiones de rs60271534 y VMS

Frequency Percent Row Pct Col Pct	Table of rs602715 by VMS_PAC			
	rs602715(rs602715)	VMS_PAC(VMS_PAC)		
		0	1	Total
	7	11 34.38 42.31 64.71	15 46.88 57.69 100.00	26 81.25
	8	5 15.63 100.00 29.41	0 0.00 0.00 0.00	5 15.63
	9	1 3.13 100.00 5.88	0 0.00 0.00 0.00	1 3.13
	Total	17 53.13	15 46.88	32 100.00

En cuanto a la presentación de efectos adversos musculo-esqueléticos el 57, 69% (Tabla 5-8) de las pacientes con 7 repeticiones manifestaron MS-AEs, mientras que ninguno de los pacientes con 8 y 9 repeticiones las manifestó.

Tabla 5-8. Relación en el número de repeticiones de rs60271534 y MS-AEs

Frequency Percent Row Pct Col Pct	Table of rs602715 by MSA_PAC			
	rs602715(rs602715)	MSA_PAC(MSA_PAC)		
		0	1	Total
	7	11	15	26
		34.38	46.88	81.25
		42.31	57.69	
		64.71	100.00	
	8	5	0	5
		15.63	0.00	15.63
		100.00	0.00	
		29.41	0.00	
	9	1	0	1
		3.13	0.00	3.13
		100.00	0.00	
		5.88	0.00	
Total	17	15	32	
	53.13	46.88	100.00	

Mao et al., [79] encontraron que las pacientes Estadounidenses clasificadas como caucásicas y portadoras con al menos 7 repeticiones TTTA de la variante rs60271534 presentaron un riesgo no significativo pero mayor con un aumento de 1,7 veces en la probabilidad de presentar artralgia asociada al consumo de IA, mientras que los portadores de al menos un alelo de 8 repeticiones tuvieron un riesgo significativamente menor. TTTA(7) se ha asociado con niveles más bajos de estrógeno en mujeres posmenopáusicas y TTTA(8) se ha asociado con niveles más altos de estrógenos [80]. Adicionalmente Ferraldeschi et al., [76] reportaron que pacientes con más de 7 repeticiones TTTA en rs60271534 presentaban TTF prolongados en comparación con los que poseían menos repeticiones.

Adicionalmente, aunque sin los suficientes argumentos estadísticos, se evidenció que potencialmente el polimorfismo rs7176005 también podría llegar a estar asociado con la respuesta al tratamiento, específicamente para el caso de la presentación de eventos adversos de acuerdo con los criterios del Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

Es importante tener en cuenta que aunque 15 de las 32 pacientes reportaron MS-AEs, tales como poliartralgias y/o dolor muscular, solo 6 de ellas (40%) presentaron efectos que según el NCI, implicaron múltiples síntomas perturbadores como cirugías u hospitalizaciones o que debieron terminar con el tratamiento dentro de los dos primeros años por limitaciones funcionales.

De las 26 pacientes que no fueron catalogadas como pacientes con respuesta adversa, el 86,67% (Tabla 5-9), tenían la presencia del alelo variante (C) para el polimorfismo rs7176005.

Tabla 5-9. Relación de rs7176005 y MS-AEs de acuerdo con el NCI

Frequency Percent Row Pct Col Pct	Table of rs717600 by EAC_INC			
	rs717600(rs717600)	EAC_INC(EAC_INC)		
		0	1	Total
	0	0	2	2
		0.00	6.25	6.25
		0.00	100.00	
		0.00	33.33	
	1	26	4	30
		81.25	12.50	93.75
		86.67	13.33	
		100.00	66.67	
	Total	26	6	32
		81.25	18.75	100.00

Fontein et al., [78] reportaron algo similar en 737 pacientes holandesas. Para dicho estudio, la presencia homocigota WT del SNPs rs7176005 se asoció con una mayor probabilidad de VMS.

Por otra parte, Wang et al., asoció éste mismo polimorfismo significativamente con un mayor cambio en la actividad de la aromatasa después del tratamiento con los inhibidores, resultando en mayor inhibición de la actividad de la aromatasa, además de cambios en los niveles de Estrona y mayor actividad de la aromatasa en el momento basal, indicando una variación en la respuesta frente al tratamiento, ya que probablemente, el nivel basal elevado de la actividad de la enzima para dichas variantes,

tendría un mayor efecto inhibitor, que puede ser debido a la existencia de más dianas farmacológicas para la inhibición [56].

Estas relaciones apoyan la posible hipótesis de que las mujeres con los polimorfismos de la enzima aromatasa asociados con menores niveles de estrógeno, sufren un mayor agotamiento de los estrógenos con la exposición al inhibidor, por lo tanto, las pone en mayor riesgo de desarrollar efectos musculo-esqueléticos y vasomotores.

Finalmente y del mismo modo que los dos polimorfismos anteriores, el rs4646 evidenció un potencial no significativo estadísticamente de estar relacionado con la presencia de MS-AEs, debido a que el 85,19% (Tabla 5-10) de las pacientes que no presentaron efectos adversos, tenían la presencia del alelo variante (A).

Tabla 5-10. Relación de rs4646 y MS-AEs de acuerdo con el NCI

Frequency Percent Row Pct Col Pct	Table of rs4646 by EAC_INC			
	rs4646(rs4646)	EAC_INC(EAC_INC)		
		0	1	Total
0	0	3	2	5
		9.38	6.25	15.63
		60.00	40.00	
		11.54	33.33	
1	1	23	4	27
		71.88	12.50	84.38
		85.19	14.81	
		88.46	66.67	
Total	Total	26	6	32
		81.25	18.75	100.00

Leyland, et al. [82] indican que las pacientes con las variantes AA / CA en rs4646 tuvieron un riesgo reducido de eventos adversos óseos.

5.6 Consideraciones Finales

Los colombianos son genéticamente similares a poblaciones americanas y debido a que mostraron variaciones interétnicas significativas en la distribución de los polimorfismos CYP19A1 con las poblaciones de ancestría africana, asiática y europea, es esencial identificar un marcador farmacogenético que podría determinar la eficacia y de los IAs en nuestra población. En este contexto, las variaciones polimórficas del gen CYP19A1 pueden tener importantes aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer de mama. Por otra parte, los síntomas músculo-esqueléticos como la artralgia y la mialgia son los eventos adversos relacionados con la IA más comunes, lo que resulta en una disminución de la eficacia del fármaco y en la interrupción prematura del tratamiento. La etnicidad es un factor importante que se relaciona con la variabilidad en la respuesta clínica. Por lo tanto, es cada vez más importante establecer los datos de frecuencia de los genes que codifican el metabolismo, el transporte, las diana y las proteínas receptoras de los fármacos dentro de una población específica para aclarar e interpretar las diferencias entre pacientes e interétnicas.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

El análisis genético de CYP19A1 evidenció que la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos farmacológicamente relevantes, fueron comparables con otras poblaciones americanas (mexicanos, peruanos y puertorriqueños) y significativamente diferentes con poblaciones de ancestría africana, asiática y europea.

Entre los SNPs estudiados, rs10459592 (50,8%) y rs700519 (3,1%) presentaron las frecuencias del alelo menor más alta y más baja, respectivamente.

El modelo usado para el análisis no encontró estadísticamente ninguna asociación entre el estado de los polimorfismos seleccionados y las características clínicas de respuesta, no obstante algunas variantes tales como rs60271534, rs7176005 y rs4646 mostraron un

comportamiento que potencialmente, con un tamaño de muestra mayor, podría representar una relación con la presentación o no de efectos adversos musculoesqueléticos y adicionalmente para el caso del polimorfismo rs60271534, con la manifestación o no de efectos vasomotores.

La identificación de variantes que se asocien con el tipo de respuesta de las pacientes que reciben tratamiento con IA teniendo en cuenta el origen étnico, podría ser una herramienta útil para orientar el tratamiento en pacientes con cáncer de mama.

6.2 Recomendaciones

Explorar si por técnicas de PCR en tiempo real es posible genotipificar sin necesidad de secuenciar, el número de repeticiones del polimorfismo rs60271534 teniendo en cuenta las curvas melting.

Investigar los polimorfismos relacionados con el metabolismo, el transporte, las diana y las proteínas receptoras de los Inhibidores de Aromatasa.

Indagar en nuevos estudios basados en muestras poblacionales más grandes de etnias americanas para confirmar con significancia estadística los hallazgos del presente estudio.

Investigar sobre la contribución de estas variantes no solo al tipo de respuesta frente al tratamiento hormonal con IA, sino también a la aparición y desarrollo de enfermedad dependiente de estrógenos en población colombiana.

7. Bibliografía

1. Globocan 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (Consulta: 15 de agosto, 2015)
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5):E359-86.
4. Pardo, C. Cendales, R. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia 2002-2006. Instituto Nacional de Cancerología. 2010; 143 p. ab.
5. Piñeros Petersen Marion, Pardo Ramos Constanza, Gamboa Garay Oscar, Hernández Suárez Gustavo. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Instituto Nacional de cancerología ESE; Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 2010; (IGAC). 90.
6. Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del cáncer de mama Sistema General de Seguridad Social en Salud – Colombia Versión para profesionales de la salud 2013 - Guía No. GPC-2013-19; ISBN: 978-958-8838-28-1
7. Weigelt B, Geyerb F, Reis-Filho J Histological types of breast cancer: How special are they?. *Molec. Oncol.* 2010;192-208
8. Lacroix M, Leclercq G about GATA3, HNF 3A and XBP, three genes coexpressed with estrogen alpha gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 219, 1-7.
9. Aranda A y Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews.* 2001; 81: 1269-1304
10. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *ProcNatlAcadSci USA.* 1996; 93: 5925-5930
11. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6359-6366
12. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2002;4:197-201.
13. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19:253–286
14. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research* 2001;2905–2919
15. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroid.* 2000;65:227-251
16. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol.* 1994;8:21–30

17. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 2003;17:1-10
18. Rosenfeld MG and Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J BiolChem* 2001;274(40):36865-36868
19. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen upand down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*. 2003;144:4562-4574
20. Morales-Vázquez. Estrategias clínicas y Desarrollo de las Bases Científicas en el Empleo de Hormonoterapia para Cáncer de Mama. *Cancerología*. 2006; 1:163-175
21. Fisher B, Costantino P, Wickerham L, Redmond K, et al., Tamoxifén for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 1998;90: 1371–1388
22. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, Desta Z, Perez EA, Ingle JN.. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J ClinOncol*. 2005; 23(36):9312-8.
23. Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, Tidy A, Ashley S. Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol* 1996;14:78-84. 21.
24. Love RR, Barden HS, Mazess RB, Epstein S, Chappell RJ. Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Intern Med* 1994;154:2585-8.
25. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-67.
26. Tamoxifen and endometrial cancer. ACOG committee opinion. No. 232. Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologists, 2000.
27. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1371-88.
28. Santen RJ, Samojlik E, Lipton A, et al. Kinetic, hormonal and clinical studies with aminoglutethimide in breast cancer. *Cancer* 1977;39:Suppl:2948-58.
29. Smith IE, Fitzharris BM, McKinna JA, et al. Aminoglutethimide in treatment of metastatic breast carcinoma. *Lancet* 1978;2: 646-9
30. Schneider R, Barakat A, Pippen J, Osborne C. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: an update. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2011;3:113–25.
31. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid BiochemMol Biol*. 2011;125:13–22.
32. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J ClinOncol*. 2010;28:509–18
33. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, et al: American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for

- postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: Status report. *J Clin Oncol*. 2005; 23:619-629.
34. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2001;19:2596-606. [Erratum, *J Clin Oncol* 2001;19:3302.]
 35. Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast carcinoma in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 2000;18:3758-67
 36. Bonnetterre J, Thurlimann B, Robertson JFR, et al. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol* 2000;18:3748-57
 37. Serdar E, Bulun, Zhihong Lin, Goncalmir, Sanober Amin, et al. Regulation of Aromatase Expression in EstrogenResponsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment. *Pharmacol Rev* 2005;57:359–383.
 38. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, and Jones M Aromatase—a brief overview. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64:93–127.
 39. Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J ClinEndocrinolMetab*. 2001;86:4600–2. 8.
 40. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid BiochemMolBiol* 2003;86:219–24.
 41. Akhtar M, Wright JN, Lee-Robichaud P. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). *J Steroid BiochemMol Biol*. 2011;125:2–12.
 42. Longcope C, Baker R, Johnston CC Jr. Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity. *Metabolism* 1986;35: 235-7.
 43. Thijssen JH, Blankenstein MA. Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25: 1953-9
 44. Sinha S, Kaseta J, Santner SJ, Demers LM, Bremmer WJ, Santen RJ. Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 1998;48:45-51.
 45. Czajka-Oraniec I, Simpson ER (2010) Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol* 61: 126–134. PMID
 46. Harada, N. (2015). Structure, Regulation and Polymorphisms of the Aromatase Gene. In *Resistance to Aromatase Inhibitors in Breast Cancer* (pp. 13-31). Springer International Publishing.
 47. Henry NL, Azzouz F, Desta Z, Li L, Nguyen AT, Lemler S, Hayden J, Tarpinian K, Yakim E, Flockhart DA, Stearns V, Hayes DF, Storniolo AM (2012) Predictors of aromatase inhibitor discontinuation due to treatment-emergent symptoms in earlystage breast cancer. *J Clin Oncol* 30(9):936–942
 48. Henry NL, Skaar TC, Dantzer J, Li L, Kidwell K, Gersch C, et al. Genetic associations with toxicity-related discontinuation of aromatase inhibitor therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138:807–16.


49. Harper-Wynne C, Ross G, Sacks N, et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: a pilot study for breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:614-21
50. Heshmati HM, Khosla S, Robins SP, O'Fallon WM, Melton LJ III, Riggs BL. Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2002;17: 172-8.
51. Morales L, Pans S, Verschueren K, Van CB, Paridaens R, Westhovens R et al (2008) Prospective study to assess short-term intraarticular and tenosynovial changes in the aromatase inhibitor-associated arthralgia syndrome. *J Clin Oncol* 26(19):3147–3152
52. Kanematsu M, Morimoto M, Honda J, Nagao T, Nakagawa M, Takahashi M et al (2011) The time since last menstrual period is important as a clinical predictor for non-steroidal aromatase inhibitor-related arthralgia. *BMC Cancer* 11:436
53. Stearns V, Ullmer L, Lopez JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D (2002) Hot flushes. *Lancet* 360(9348):1851–1861
54. Elisaf MS, Bairaktari ET, Nicolaidis C, et al. Effect of letrozole on the lipid profile in postmenopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:1510-3
55. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Corone LJ, Pelleymounter L, Wang L, et al. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005;65:11071–82.
56. Wang L, Ellsworth KA, Moon I, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Martin YN, et al. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res.* 2010;70:319–28
57. Gingeras TR. Implications of chimaeric non-co-linear transcripts. *Nature* 461. 2009; 206–211. doi: 10. 1038/nature08452 PMID: 19741701
58. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW, Stram DO, Dunning AM, et al. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res* 67. 2007; 1893–1897. PMID: 17325027.
59. Travis RC, Schumacher F, Hirschhorn JN, Kraft P, Allen NE, et al. CYP19A1 genetic variation in relation to prostate cancer risk and circulating sex hormone concentrations in men from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18. 2009; 2734–2744. doi: 10.1158/ 1055-9965.EPI-09-0496 PMID: 19789370.
60. Paynter RA, Hankinson SE, Colditz GA, Kraft P, Hunter DJ, et al. CYP19 (aromatase) haplotypes and endometrial cancer risk. *Int J Cancer* 116.2005; 267–274. PMID: 15800924.
61. Starlard-Davenport A, Orloff MS, Dhakal I, Penney RB, Kadlubar SA Genotypic and Allelic Variability in CYP19A1 among Populations of African and European Ancestry. *PLoS ONE* 10(2). 2015; e0117347. doi:10.1371/journal.pone.0117347
62. Park IH, Lee YS, Lee KS, Kim SY, Hong SH, Jeong J, et al. Single nucleotide polymorphisms of CYP19A1 predict clinical outcomes and adverse events associated with letrozole in patients with metastatic breast cancer. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2011;68:1263–71

63. Starlard-Davenport A, Orloff MS, Dhakal I, Penney RB, Kadlubar SA. Ethnic differences in CYP19A1 intronic SNPs and haplotype distributions among African American and Caucasian populations. [abstract]. In: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; AACR; Cancer Res 2014;74(19 Suppl):Abstract nr 547. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-547
64. Ghimenti, C., Mello-Grand, M., Grosso, E., Scatolini, M., Regolo, L., Zambelli, A., & Chiorino, G. (2013). Regulation of aromatase expression in breast cancer treated with anastrozole neoadjuvant therapy. *Experimental and therapeutic medicine*, 5(3), 902-906.
65. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:811–6.
66. Hadfield KD, Newman WG. Pharmacogenetics of aromatase inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2012;13:699–707.
67. Liu L, Bai YX, Zhou JH, Sun XW, Sui H, Zhang WJ, et al. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor, anastrozole, in metastatic breast carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2013;14:18973–88
68. Miron L, Negură L, Peptanariu D, Marinca M. Research on aromatase gene (CYP19A1) polymorphisms as a predictor of endocrine therapy effectiveness in breast cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2012;116:997–1004.
69. Gervasini, G., Jara, C., Olier, C., Romero, N., Martínez, R., & Carrillo, J. A. (2016). Polymorphisms in ABCB1 and CYP19A1 genes affect anastrozole plasma concentrations and clinical outcomes in postmenopausal breast cancer patients. *British journal of clinical pharmacology*.
70. Zins, K., Mogg, M., Schneeberger, C., Abraham, D., & Schreiber, M. (2014). Analysis of the rs10046 polymorphism of aromatase (CYP19) in premenopausal onset of human breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 15(1), 712-724.
71. García-Casado Z, Guerrero-Zotano A, Llombart-Cussac A, Calatrava A, Fernandez-Serra A, Ruiz-Simon A, et al. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene defines a subgroup of postmenopausal breast cancer patients with poor response to neoadjuvant letrozole. *BMC Cancer*. 2010;10:36
72. Long, J. R., Kataoka, N., Shu, X. O., Wen, W., Gao, Y. T., Cai, Q., & Zheng, W. (2006). Genetic polymorphisms of the CYP19A1 gene and breast cancer survival. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(11), 2115-2122
73. Shao, X., Guo, Y., Xu, X., Zheng, Y., Wang, J., Chen, Z., ... & Wang, X. (2015). The CYP19 RS4646 Polymorphism Is Related to the Prognosis of Stage I–II and Operable Stage III Breast Cancer. *PloS one*, 10(3), e0121535.
74. Shao, X., Cai, J., Zheng, Y., Wang, J., Feng, J., Huang, Y., ... & Wang, X. (2015). S4646 polymorphism in CYP19A1 gene is associated with the efficacy of hormone therapy in early breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 5309.
75. Artigalás, O., Vanni, T., Hutz, M. H., Ashton-Prolla, P., & Schwartz, I. V. (2015). Influence of CYP19A1 polymorphisms on the treatment of breast cancer with aromatase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*, 13(1), 139.

76. Ferraldeschi R, Arnedos M, Hadfield KD, A'Hern R, Drury S, Wardley A, et al. Polymorphisms of CYP19A1 and response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:1191–8.
77. Amir E, Seruga B, Niraula S, Carlsson L, Ocaña A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1299–309.
78. Fontein DB, Houtsma D, Nortier JW, Baak-Pablo RF, Kranenbarg EM, van der Straaten TR, et al. Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144:599–606
79. Mao JJ, Su HI, Feng R, Donelson ML, Aplenc R, Rebbeck TR, et al. Association of functional polymorphisms in CYP19A1 with aromatase inhibitor associated arthralgia in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R8.37.
80. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW, Stram DO, Dunning AM, Thomas G, Thun MJ, Albanes D, Altshuler D, Ardanaz E, Boeing H, Buring J, Burt N, Calle EE, Chanock S, Clavel-Chapelon F, Colditz GA, Cox DG, Feigelson HS, Hankinson SE, Hayes RB, Henderson BE, Hirschhorn JN, Hoover R, Hunter DJ, Kaaks R, Kolonel LN, Le Marchand L, Lenner P, Lund E, et al: Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res.* 2007, 67: 1893-1897. 10.1158/0008-5472.CAN-06-4123.
81. Napoli N, Rastelli A, Ma C, Yarramaneni J, Vattikuti S, Moskowitz G, et al. Genetic polymorphism at Val80 (rs700518) of the CYP19A1 gene is associated with aromatase inhibitor associated bone loss in women with ER + breast cancer. *Bone.* 2013;55:309–14
82. Leyland-Jones, B., Gray, K. P., Abramovitz, M., Bouzyk, M., Young, B., Long, B., ... & Lyng, M. B. (2015). CYP19A1 polymorphisms and clinical outcomes in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer in the BIG 1–98 trial. *Breast cancer research and treatment*, 151(2), 373-384.
83. Artigalás, o. a. p. (2015). *Estudo farmacogenético e farmacoeconomico em pacientes brasileiras portadoras de câncer de mama tratadas com inibidores daaromatase* (doctoral dissertation, universidade federal do rio grande do sul).
84. Johansson, H., Gray, K. P., Pagani, O., Regan, M. M., Viale, G., Aristarco, V., ... & Colleoni, M. (2016). Impact of CYP19A1 and ESR1 variants on early-onset side effects during combined endocrine therapy in the TEXT trial. *Breast cancer research*, 18(1), 110.
85. Köchl, S., Niederstätter, H., and Parson, W. (2005). ADN extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. In *Methods in Molecular Biology*, A. Carracedo, ed. (Totowa, Nj: Humana Press), pp. 13–30.
86. Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(4), 246-258.
87. Huang, C. S., Kuo, S. H., Lien, H. C., Yang, S. Y., You, S. L., Shen, C. Y., ... & Chang, K. J. (2008). The CYP19 TTTA repeat polymorphism is related to the prognosis of premenopausal stage I–II and operable stage III breast cancers. *The oncologist*, 13(7), 751-760.

88. Hartl, D.L. (2000). A Primer of Population Genetics. (Sunderland, Massachusetts. U.S.A: Sinauer Associates, Incorporated), pp. 26–31.
89. Stokes, Maura E., Charles S. Davis, and Gary G. Koch. 2000. Categorical Data Analysis Using the SAS® System, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
90. SAS Institute Inc. 2015. SAS/STAT® 14.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

A. Anexo: Aprobación de la Junta de Revisión Institucional del Comité de Ética de La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia


UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 019-180-15
Fecha: 12 de noviembre 2015

Nombre completo del proyecto: "GENOTIPICACIÓN Y FRECUENCIAS ALÉLICAS DE POLIMORFISMOS (SNPs) DEL GEN CYP19A1 EN POBLACIÓN COLOMBINA, IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO HORMONAL CON INHIBIDORES DE AROMATASA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Diana Carolina Guerrero Pulido

Presentado por: el profesor Harvy Mauricio Velasco Parra, Coordinador Académico

Departamento o Sección: Maestría en Genética Humana de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 12 de noviembre de 2015

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Patología
2	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Departamento de Morfología
3	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
4	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Presidente Comité de Ética / Departamento de Ciencias Fisiológicas
5	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

Elb/, Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, **FACULTAD DE MEDICINA**, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmboq@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA

ACTA DE EVALUACIÓN

3. El Comité consideró que el presente estudio:

a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética, de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana

Cargo: Presidente Comité de Ética

Elb/ Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401

Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008

Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co

Bogotá, Colombia, Sur América

B. Anexo: Aprobación de la Junta del Comité de Ética del Hospital Militar Central



HOSPITAL
MILITAR
CENTRAL



"Salud - Calidad - Humanización"

26 ABR 2016

Bogotá, D.C.,

N° 12322 DIGE-CEI

A los : Doctores
Fabio Ancizar Aristizabal Gutiérrez
Luis Eduardo Pino Villareal
Diana Carolina Guerrero Pulido
Investigadores
Hospital Militar Central

Asunto : APROBACIÓN

PROTOCOLO 2016- 008

"Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en Población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama"

Respetados Investigadores:

El Comité de Ética en Investigación del Hospital Militar Central en reunión del 22 de abril de 2016 según consta en el Acta No. 08.

El quórum se obtiene con la participación mayor al 50%

Asisten 7 de los 11 miembros con voz y voto, Quórum: 63.63%

No.	NOMBRE	CARGO	PROFESIÓN
1.	Javier Ignacio Godoy Barbosa	Presidente	Oncólogo Clínico - Bioeticista
2.	Gabriel Adolfo Centanaro Meza	Miembro	Neurólogo - Bioeticista
3.	Mauricio Alexis Parra Calcedo	Miembro	Cirujano General-Bioeticista
4.	Claudia Liliana Echeverría González	Miembro	Pediatra-Magister en Epidemiología
5.	Flor Alexandra Rodríguez Vargas	Miembro	Química Farmacéutica
6.	Flor Ángela Calderón Olaya	Miembro	Enfermera - Bioeticista
7.	Coronel Luz Elcy Zamora Sánchez	Miembro de la Comunidad	Contadora
	Enf. Ingrid Janneth Horta	Secretaría Coordinadora	Con voz pero sin voto

Revisó, atendió la presentación por parte de la Doctora Diana Carolina Guerrero y recibida el requerimiento a la solicitud de fecha 8 Abril del año en curso

APRUEBA:

El estudio de la referencia teniendo en cuenta:

Categoría : Investigación con riesgo mínimo

Consentimiento Informado : Solicitado, presentado, se entrega firmado y fechado en 5 folios

Cuestionario para la participación en un proyecto de Investigación: Solicitado, presentado, se entrega firmado y fechado en 2 folios.

"Salud - Calidad - Humanización"



**HOSPITAL
MILITAR
CENTRAL**



"Salud - Calidad - Humanización"

CONCEPTO: Estudio analítico de corte transversal, etapa experimental, que adopta los principios de investigación biomédica para investigación en seres humanos a nivel Nacional.

1. Resolución No. 8430 de Octubre de 1993

NOTA:

Para ser desarrollado en la Universidad Nacional de Colombia, debe ceñirse por completo a los lineamientos para investigación de la Universidad Nacional de Colombia Comité de Ética Facultad de Medicina.

IMPORTANTE:

1. No aplicar cambios a los documentos aprobados en esta acta sin previo conocimiento y aprobación por parte de éste Comité.
2. Presentar informe final al Comité de Ética en Investigación.
3. Para dar inicio al protocolo se requiere el Aval Institucional emitido por el Comité de Investigación Institucional

El Comité de Ética en investigación del Hospital Militar Central opera de acuerdo con:

- Regulación Internacional
 1. Normas de Buenas Prácticas Clínicas (ICH_ GCP)
 2. Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil 2013)
 - Regulación Nacional
 3. Resolución 8430 de 1993 (04 de Octubre)
 4. Resolución 2378 de 2008 (Junio 27)
 - Regulaciones Institucionales
 - Resolución 545 del 27 de junio de 2014
- Regulaciones del Comité.

Comité de Ética en Investigación
Hospital Militar Central
Transversal 3 No. 49 -00 Piso 13
Telefax: 571 3486868 Ext. 5363-5136

Con un saludo institucional,

DR. JAVIER IGNACIO GODOY BARBOSA
Servidor Misional en Sanidad Militar
Comité de Ética en Investigación
Presidente

Elaboro: Edna Suárez

"Salud - Calidad - Humanización"

Transversal 3ª No. 49-00 - Conmutador 3486868 Ext. 5136 - www.hospitalmilitar.gov.co
Bogotá, D.C. - Colombia

C. Anexo: Consentimiento informado para la participación en el proyecto.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

"Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama".

Usted está invitada a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y el Hospital Militar Central, que será desarrollado por los siguientes investigadores:

Dr. Fabio Ancizar Aristizabal. PhD en Ciencias Biológicas y Biología Molecular. Director del Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (Bogotá).

Lic. Diana Carolina Guerrero Pulido, MSc(c) en Genética Humana.

Dr. Luis Eduardo Pino Villarreal. Hemato/Oncólogo. Subdirector de Docencia e Investigación Científica. Hospital Militar Central

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite entender conceptos sobre la enfermedad, de manera que los beneficios posteriores podrían ser para usted, su familia u otros individuos afectados.
- (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente.
- (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación.
- (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por nuestra parte o de las instituciones colaboradoras, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material genético.
- (f) Confidencialidad: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Biotecnología. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos suministre son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.


122 ABR 2016

(g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador.

(h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

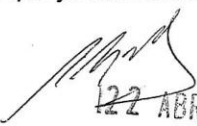
EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVO:

El cáncer de mama es una enfermedad con gran impacto a nivel mundial, dado que es una de las patologías con mayor prevalencia en mujeres y el cáncer con mayor tasa de mortalidad en varios países. En términos de porcentaje, al cáncer de mama se le atribuyen el 25,2% de los nuevos casos de cáncer y el 14,7% de la mortalidad. Durante los últimos años, las investigaciones sobre el cáncer de mama han tenido como objetivo principal la identificación de variantes genéticas que estén asociadas a riesgo de padecer la enfermedad o al riesgo de recurrencia que permita establecer nuevos marcadores de respuesta a tratamiento para determinar los procedimientos que serán los mejores para cada paciente. Variantes genéticas en el gen de la aromatasa (CYP19A1) han sido investigados por su posible asociación con la eficacia terapéutica de los inhibidores de la aromatasa y con los niveles de hormonas sexuales o de riesgo para enfermedades dependientes de estrógeno. Las características genotípicas de este gen ya han sido estudiadas en muchos grupos étnicos; sin embargo, las características genéticas de esta enzima son desconocidos en la población colombiana. El objetivo de esta propuesta de investigación es genotipificar y establecer las frecuencias alélicas de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen de la aromatasa CYP19A1 en población colombiana y analizar si las variantes genéticas implicadas en la respuesta a tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa reportadas en otras poblaciones de pacientes con cáncer de mama, se asocian con parámetros histopatológicos del tumor y con el tipo de respuesta (positiva, negativa o adversa).

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con usted y se efectuará el siguiente procedimiento: Se tomará una muestra de aproximadamente 8 ml de sangre mediante punción en vena periférica. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio en el Instituto de Biotecnología y/o de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento, es posible que en el caso de las pacientes debido a su condición se pueda presentar inflamación o hematoma.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES: Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones: Comprende que el riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en la salud, en el caso de las pacientes que ya han iniciado su


22 ABR 2016

tratamiento de quimioterapia es posible que se evidencie inflamación o hematoma. Comprende que no hay indemnización para su participación en este estudio. Comprende que la participación en este proyecto de investigación no incluye el tratamiento requerido. Conoce que la decisión de participar en esta investigación, es absolutamente voluntaria. Si no desea participar en ella o, una vez iniciada la investigación, no desea seguir colaborando, puede hacerlo sin problemas. En ambos casos, se le asegura que su negativa no implicará ninguna consecuencia negativa.

AUTORIZACIÓN: Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores.

☐ Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

☐ Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones Nacionales y/o Internacionales, enviando la muestra al exterior a el (los) laboratorio(s) del(los) instituto(s) antes mencionado(s).

☐ Si ☐ No

- En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia.

☐ Si ☐ No

- En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:

☐ Si ☐ No

- En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:

☐ Si ☐ No

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones Nacionales y/o Internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación.

☐ Si ☐ No

En cualquiera de los casos anteriores, los estudios posteriores deberán ser aprobados por Comité de ética.


122 ABR 2016 3

D. Anexo: Autorización para la toma de muestra e inclusión voluntaria en la investigación.

AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN VOLUNTARIA EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

"Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama".

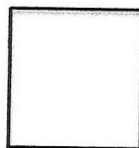
Fecha: _____

Yo, _____ con documento de identificación No. _____ de _____, he leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él y la necesidad de hacer constar mi consentimiento para lo cual lo firmo libre y voluntariamente, aceptando que se me tome una muestra de sangre con el fin de realizar el análisis. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará a la muestra.

Firma _____

Dirección: _____

Teléfono: _____



Huella

Nombres y apellidos del Testigo 1: _____

Firma: _____ Cédula: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Relación con la paciente: _____

Nombres y apellidos del Testigo 2: _____

Firma: _____ Cédula: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Relación con la paciente: _____


12/2 ABR 2016

Nombres y apellidos completos de la persona que explicó el consentimiento informado:

Firma: _____

C.C: _____

En caso de tener alguna duda o pregunta por su participación como sujeto de investigación, Favor comuníquese con los investigadores del proyecto o con el Dr. Javier Ignacio Godoy, presidente del Comité de Ética de Investigación al teléfono 3486868 ext 5136

Dr. Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez	<p>Cargo: Profesor Asociado- Departamento de Farmacia- Facultad de Ciencias; Director del Instituto de Biotecnología Universidad Nacional</p> <p>Contacto: Correo: faaristizabalg@unal.edu.co Teléfono: 3145000 Ext. 14643 / 3108067340</p>
Lic. Diana Carolina Guerrero Pulido MSc(c)	<p>Cargo: Estudiante de Maestría en Genética Humana. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia</p> <p>Contacto: Correo: dcguerrerop@unal.edu.co Teléfono: 7851674 / 3138493910</p>
Dr. Luis Eduardo Pino Villarreal	<p>Cargo: Hemato/Oncólogo. Subdirector de Docencia e Investigación Científica Clínica. Hospital Militar central</p> <p>Contacto: Correo: docpino2@gmail.com Teléfono: 6191391 / 3103206337</p>


22 ABR 2016 5

E. Anexo: Cuestionario para la participación en el proyecto de investigación.

CUESTIONARIO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA- HOSPITAL MILITAR CENTRAL

"Genotipificación y frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) del gen CYP19A1 en población Colombiana, implicados en la respuesta al tratamiento hormonal con inhibidores de aromatasa en pacientes con cáncer de mama".

Fecha actual: _____
Nombre: _____
Fecha de Nacimiento: _____
Edad: _____
Año de Diagnóstico: _____
Edad de Diagnóstico: _____
Peso: _____
Estatura: _____
IMC: _____
Edad de Menarquia: _____
Edad de Menopausia: _____
¿Tiene antecedentes familiares directos (madre, hermana, hija) con cáncer de mama?: _____
¿Tiene antecedentes personales de enfermedad mamaria benigna (quiste no maligno)? _____
¿A qué edad se hizo su primera mamografía? _____
¿Con qué frecuencia realiza mamografías? _____ ¿Cuántas hasta ahora? _____
¿Tiene Hijos? _____ ¿Cuántos? _____
¿Amamantó? _____ ¿Cuánto tiempo? _____ ¿Tuvo problemas al amamantar? _____
¿Consumió terapia Hormonal de reemplazo para la menopausia? _____
¿Consumió terapia hormonal anticonceptiva? _____ ¿Cuánto tiempo? _____
¿Tomó medicamentos para finalizar la producción de leche? _____
¿A presentado efectos secundarios con el tratamiento? _____ ¿Cuáles? _____

Datos de contacto:

Nombre: _____
Dirección: _____
Teléfono: _____
Correo: _____


12 ABR 2016

Datos de la Historia Clínica

¿Previamente presento otro tipo de cáncer?

Tipo de carcinoma:

Fecha de cirugía:

Tipo de cirugía:

Estadio:

ER	Positivo	Negativo			
PR	Positivo	Negativo			
HER2	Positivo	Negativo			
Quimioterapia adyuvante	Si	No			
Número de sitios de metástasis	1	2	>3		
Sitios de metástasis. Si No:	Hígado	Pulmón	Hueso	Tejido Blando	
Tratamiento	Neoadyuvante	Adyuvante			
Línea de tratamiento	Primera	Segunda			
Inhibidor de Aromatasa	Letrozol	Anastrozol	Exemestano		
Dosis		mg/día			
Tiempo de tratamiento					
Respuesta clínica	CR	PR	SD	PD	
Efectos Adversos	VMS	AEs			
Tiempo de aparición de Efectos Secundarios					
Radioterapia					
Hormonoterapia adicional					



2

122 APR 2015